

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Bestimmung von Antikörpern gegen Reoviren
und Adeno-assoziierte Viren beim Huhn
mit Hilfe des ELISA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johanna Schwarzmaier geb. Kayser
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1983
Journal-Nr. 1144



Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

**Bestimmung von Antikörpern gegen Reoviren
und Adeno-assoziierte Viren beim Huhn
mit Hilfe des ELISA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johanna Schwarzmaier geb. Kayser
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1983
Journal-Nr. 1144

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent: Prof. Dr. G. Monreal

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. G. Pauli

Tag der Promotion: 17. Oktober 1983

ABKÜRZUNGEN

AAAV	Aviäres Adeno-assoziiertes Virus
AF	Allantoisflüssigkeit
AGP	Agar-Gel-Präzipitation
CAM	Chorioallantoismembran
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GMT	Geometrischer Mittelwert der Titer
IB	Infektiöse Bronchitis
ID	Infektiöse Dosis
IF-Test	indirekter Immunofluoreszenz-Test
ILT	Infektiöse Laryngotracheitis
OPD	Ortho-Phenylendiamin
PBE	Plaque-bildende Einheit
PBS	phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung
p.i.	post infectionem
RNS	Ribonukleinsäure
SPF	spezifiziert pathogenfrei
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
UpM	Umdrehungen pro Minute
VNT	Virusneutralisationstest



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Literatur

- 2.1. Vorkommen, Bedeutung und Diagnose von Reovirus-Infektionen
- 2.2. Vorkommen, Bedeutung und Diagnose von AAV-Infektionen
- 2.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
 - 2.3.1. Der ELISA zur Diagnose von Virusinfektionen beim Huhn
 - 2.3.2. Der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Reovirus und AAV

3. Material und Methoden

- 3.1. Virusstämme und Virusvermehrung
 - 3.1.1. Reovirus
 - 3.1.2. AAV
- 3.2. Virusreinigung und Antigenherstellung
 - 3.2.1. Reovirus
 - 3.2.2. AAV
- 3.3. Virustitration
- 3.4. Proteinbestimmung
- 3.5. Seren
- 3.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
 - 3.6.1. Konjugat
 - 3.6.2. Substrat
 - 3.6.3. Photometrische Messung
 - 3.6.4. Durchführung des ELISA
- 3.7. Agar-Gel-Präzipitation (AGP)
- 3.8. Indirekter Immunofluoreszenz-Test (IF-Test)
 - 3.8.1. Reovirus
 - 3.8.2. AAV
- 3.9. Virusneutralisationstest (VNT)
- 3.10. Immunisierungsversuch

4. Versuchsergebnisse

4.1. Untersuchung verschiedener Antigen-Präparationen auf ihre Verwendbarkeit im ELISA

4.1.1. Reo-ELISA

4.1.2. AAV-ELISA

4.2. Festlegung der Unterscheidungsgrenze zwischen positiven und negativen Seren und Überprüfung der Spezifität beider ELISA-Systeme

4.3. Sensibilität der ELISA-Systeme

4.3.1. Reo-ELISA

4.3.1.1. Vergleich der Sensibilität von ELISA, AGP und IF-Test

4.3.1.2. Vergleich der Sensibilität und der Titer von ELISA und IF-Test

4.3.2. AAV-ELISA

4.3.2.1. Vergleich der Sensibilität von ELISA und AGP

4.3.2.2. IF-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen AAV

4.4. Titerverlauf nach Infektion mit AAV und Adenovirus

4.5. Verbreitung von Reovirus- und AAV-Infektionen in Elterntierbeständen

5. Diskussion der Ergebnisse

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

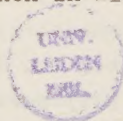
1. EINLEITUNG

Reovirus-Infektionen beim Geflügel sind weltweit verbreitet. Sie verlaufen häufig klinisch inapparent, können jedoch auch Ursache für Erkrankungen des Respirationsapparates, des Intestinaltraktes sowie der Gelenke, Sehnen und Sehnenscheiden sein. Vermutlich kommt ihnen auch bei der Entstehung von Faktorenkrankheiten eine gewisse Bedeutung zu.

Als serologische Nachweismethode steht die Agar-Gel-Präzipitation im Vordergrund, die jedoch zu wenig sensibel ist, um alle Antikörper enthaltenden Seren als positiv zu erkennen. Auch kann mit ihr nur ein qualitativer, kein quantitativer Antikörpernachweis geführt werden.

Aviäre Adeno-assoziierte Viren (AAAV) sind defekte Parvoviren (Dependo-Viren), die sich nur in Gegenwart von Adenoviren vermehren können. Obwohl ihre Bedeutung bisher noch unklar ist, könnten sie einen Einfluß auf die Vermehrung von Adenoviren haben und damit deren Wirkung auf den infizierten Organismus beeinflussen.

Für den Nachweis von Antikörpern, nicht zuletzt beim Ablauf inapparenter Infektionen, ist eine sensible und spezifische Methode von Bedeutung. Da der ELISA in der Routinediagnostik inzwischen eine weite Verbreitung gefunden hat, sollte in der vorliegenden Arbeit diese Methode auf ihre Eignung zum Nachweis von Reo- und AAAV-Antikörpern geprüft werden. Gleichzeitig sollte mit Hilfe dieser Technik die Verbreitung von Reovirus- und AAAV-Infektionen in Elterntierbeständen untersucht werden.



2. LITERATUR

2.1. Vorkommen, Bedeutung und Diagnose von Reovirus-Infektionen

Reoviren sind RNS-haltige unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von ungefähr 75 nm. Sie besitzen keine hämagglutinierenden Eigenschaften gegenüber Erythrozyten von Hühnern, Puten, Rindern oder Menschen (16). Verschiedene Autoren stellten fest, daß Reoviren auf das Ei übertragbar sind (9,28,46).

Reovirus-Infektionen beim Geflügel kommen weltweit vor (34). Sie verlaufen in der Regel klinisch inapparent und werden deshalb meist nicht erkannt (4). In Ausnahmefällen können sie jedoch Erkrankungen verschiedener Organsysteme hervorrufen. FAHEY und CRAWLEY isolierten 1954 im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen beim Huhn ein Virus (12), das 1972 von OLSON und WEISS als Reovirus identifiziert wurde (36). KAWAMURA und Mitarbeiter berichten ebenfalls über respiratorische Erkrankungen beim Huhn infolge einer Reovirus-Infektion (22). Sie differenzierten dabei fünf Serotypen. Verschiedene Autoren isolierten Reoviren von Hühnern, die an einer Enteritis erkrankt waren (8,23), sowie von Puten mit sog. bluecomb disease, einer infektiösen Enteritis (13,15,51). 1957 fanden OLSON und Mitarbeiter bei Hühnern, die an einer Arthritis erkrankt waren, neben Mycoplasma synoviae ein weiteres Agens (35), das 1972 von WALKER et al. als Reovirus identifiziert wurde (49). Die Isolierung von Reoviren im Zusammenhang mit Arthritiden gelang auch anderen Autoren (16,36,45). Arthritiden sind heute insbesondere bei Broilern von großer Bedeutung.

Reoviren wurden ferner von Hühnern mit rupturierter Gastrocnemiussehne (20) sowie von Hühnern, die an einer Myo- und Pericarditis erkrankt waren (33), isoliert. BAINS und Mitarbeiter bringen die Entstehung eines Hydroperikards bei Broilern mit Reoviren in Zusammenhang (2).

PESHMUKH und POMEROY berichten über Verklebungen der Kloake, die bei Küken nach Infektion mit Reoviren auftraten (9). Wurden die Tiere jedoch unter keimfreien Bedingungen gehalten, so blieben die Krankheitserscheinungen aus. Hieraus ist zu schließen, daß es erst durch eine bakterielle Sekundärinfektion zu klinischen Erscheinungen kam, die Reoviren also nur Wegbereiter waren. Entsprechend könnten Reovirus-Infektionen auch bei anderen Faktorenkrankheiten von Bedeutung sein.

Der Nachweis von Reovirus-Infektionen kann bei klinisch erkrankten Tieren durch direkten Erregernachweis geführt werden. Verschiedenen Autoren gelang die Isolierung des Virus aus der Trachea (21), dem Intestinaltrakt (21), dem Sprunggelenk (16,21,25), dem Fußkissen (21) sowie den Beinsehnen (45).

Weit größere Bedeutung hat der Antikörpernachweis. Insbesondere klinisch inapparente Reovirus-Infektionen sind nur auf diese Weise zu diagnostizieren. Hier wurden die Agar-Gel-Präzipitation (4,36,45), der indirekte Immunfluoreszenz-Test (4), der Virusneutralisationstest (4,28) sowie der ELISA (42) beschrieben.

VON BULOW weist darauf hin, daß der indirekte Immunfluoreszenz-Test (IF-Test) dem Virusneutralisationstest (VNT) insofern überlegen ist, als seine Ergebnisse von einzelnen Reovirus-Serotypen völlig unabhängig sind. Ferner erwies sich die Agar-Gel-Präzipitation (AGP) als weit weniger sensibel (4).

MENENDEZ und Mitarbeiter (28) verglichen die Sensibilität von AGP und VNT und stellten fest, daß Antikörper mit beiden Tests 10 Tage p.i. nachzuweisen waren, die neutralisierenden jedoch länger persistierten als die präzipitierenden.

SLAGHT und Mitarbeiter berichten über die Anwendung eines ELISA zum Nachweis von Reo-Antikörpern (42). Sie stellten fest, daß er sensitiver, einfacher, billiger und schneller durchführbar ist als die AGP.

2.2. Vorkommen, Bedeutung und Diagnose von AAV-Infektionen

Das Adeno-assoziierte Virus ist ein defektes Parvovirus, das sich nur in Anwesenheit eines Helfervirus vermehren kann. Untersuchungen über die einzelnen Vorgänge bei der Vermehrung ergaben, daß Adsorption, Penetration und Uncoating unabhängig vom Helfervirus erfolgen, während für die Nukleinsäuresynthese und den Zusammenbau des Virions das Helfervirus zwingend erforderlich ist (55). Es zeigte sich, daß bei Verwendung von Adenoviren als Helfer intakte Viruspartikel synthetisiert werden, während es in Anwesenheit von Herpesviren zwar zu einer Nukleinsäuresynthese, nicht jedoch zum Zusammenbau der Virionen kommt (55). Verschiedene Autoren berichten über die Isolierung von Adeno-assoziierten Viren beim Menschen (19), Affen (1), Rind (24), Hund (44) sowie bei der Pute (41).

1973 wurde ein Aviäres Adeno-assoziiertes Virus (AAAV) von YATES und Mitarbeitern erstmalig von Hühnern isoliert und als solches identifiziert (52). Es zeigte sich, daß die Vermehrung des AAAV in embryonierten Hühnereiern und Hühnerembryo-Nierenzellkulturen nur gelang, wenn die Beimpfung mit AAAV und Adenovirus erfolgte. Wurde als Impfmateriel reines AAAV verwendet, kam es zu keiner Virusvermehrung.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß AAAV aus Kotproben infizierter Tiere nur isoliert werden konnte, wenn die Infektion mit AAAV und einem aviären Adenovirus erfolgt war. Ferner bildeten Tiere, die ausschließlich mit AAAV infiziert worden waren, keine präzipitierenden Antikörper, während Tiere, die mit AAAV und Adenovirus infiziert worden waren, schon eine Woche p.i. in der AGP positiv reagierten (54).

YATES untersuchte 1975 klinisch gesunde Hühner auf die Anwesenheit von Adenoviren, indem er das Virus aus Kot- und Gewebeproben isolierte. Dies gelang ihm bei 64-100 % bei Hühnern, die 5 Wochen und älter waren. 38 Virus-Isolate

wurden auf AAV untersucht, wobei nur in 2 Isolaten AAV nachgewiesen werden konnte. Dies lag vermutlich an der geringen Sensibilität des verwendeten Testsystems oder aber an den niedrigen Virustitern der jungen Tiere (53).

Über pathogene Wirkungen des AAV ist nichts bekannt. PRONOVOST und Mitarbeiter stellten fest, daß das AAV die Pathogenität des Adenovirus herabsetzt. Dies geschieht in umso stärkerem Maße, je höher die AAV-Infektionsdosis ist (37).

Wie Untersuchungen von RHEE zeigen, kommt es durch das AAV auch in Zellkulturen und Hühnerembryonen zu einer Hemmung der Adenovirus-Vermehrung (39).

Nach Angaben von BÜLOW unterscheiden sich die Adenovirusstämme CELO und Tipton nur insofern, als CELO-Antigen frei von AAV ist, während Tipton-Antigen Adenovirus und AAV enthält (5).

An serologischen Nachweisverfahren für AAV-Antikörper sind die AGP (5,30,54), der VNT (6,30), der ELISA (7) und der Immunoagglutinationstest (30) beschrieben worden.

Als Antigen für die AGP kann AAV- und Adenovirus-haltiges CAM-Homogenat von Tiptonvirus-infizierten Embryos verwendet werden. Um AAV- und Adenovirus-Präzipitine voneinander unterscheiden zu können, muß jedoch stets ein monospezifisches AAV-Serum mit aufgetragen werden (5). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von gereinigtem AAV als Antigen, was jedoch mit einem erheblich größeren Aufwand verbunden ist (5).

Für die anderen oben genannten serologischen Tests kann nur hochgereinigtes AAV als Antigen verwendet werden, da es sonst zu einer Reaktion der in den Seren immer mit enthaltenen Antikörper gegen Adenoviren mit Adenovirus-Antigenen und so zu falsch positiven Ergebnissen kommt.

Die Agglutination der Virionen mit AAV-Antikörpern im Immunoagglutinationstest wird mit Hilfe des Elektronenmikroskops sichtbar (30).

2.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde im Jahre 1971 von VAN WEEMEN und SCHUURS (47) und ENGVALL und PERLMANN (10) entwickelt. Er hat seither in der Laboratoriumsdiagnostik eine weite Verbreitung gefunden. Gründe hierfür sind seine hohe Sensibilität, die mit der des Radio-Immun-Assay vergleichbar ist, seine einfache Durchführbarkeit, sein geringer Kostenaufwand sowie die Stabilität der Reagenzien (11).

Der ELISA kann sowohl in direkter Form zum Nachweis von Virus-Antigenen, als auch in indirekter Form zum Nachweis von Antikörpern angewandt werden (11,48). Mit dem ELISA können Antikörper gegen Viren, Bakterien sowie Parasiten nachgewiesen werden (48).

Auf die Notwendigkeit, die genaue Versuchsanordnung für jedes ELISA-System neu festzulegen, haben VOLLER et al. (48) und BIDWELL et al. (3) hingewiesen.

2.3.1. Der ELISA zur Diagnose von Virusinfektionen beim Huhn

In den letzten Jahren sind eine Reihe Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit dem ELISA in der Diagnostik von Virusinfektionen bei Hühnern befassen. So wurde der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bursitis (26), das EDS-76-Virus (32), das IB-Virus (14,17, 18,27,31,43,50), das ILT-Virus (29), das Reovirus (42), das Adeno- und Adeno-assoziierte Virus (7) und das Adenovirus (32) beschrieben.

2.3.2. Der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Reovirus und AAV

SLAGHT und Mitarbeiter berichten über einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren (42). Die Virusvermehrung

erfolgte auf Hühnerembryo-Fibroblastenkulturen. Über eine Reinigung des Zellkulturmaterials werden keine Angaben gemacht. Vor der Antigeninkubation wurden die ELISA-Platten mit hitzeinaktiviertem Kälberserum und nach dem Trocknen mit 2 %iger Glutaraldehyd-Lösung für 30 Minuten beschichtet. Als Inkubationsmedium für die Serum- und Konjugatverdünnungen diente 0,5 M Natriumchlorid-Lösung mit 1 % Tween 80, pH 7,5. Mit Reo-Hyperimmunseren wurden Titer bis zu 1:13 000 erreicht. Bei Verdünnungen unter 1:100 verursachten jedoch auch SPF-Seren infolge unspezifischer Bindungen eine starke Reaktion.

DAWSON und Mitarbeiter beschreiben einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Adeno- und Adeno-assoziierte Viren (7). Die Virusvermehrung erfolgte in embryonierten Hühnereiern. Anschließend wurde das Material 6mal im Gleichgewichtsgradienten gereinigt und 4 Tage gegen Carbonat-Bicarbonat-Puffer dialysiert. Bei einer Verdünnung dieser Antigen-Präparation von 1:10 waren die im ELISA erreichten Titer mit denen des VNT vergleichbar. Als Inkubationsmedium für die Serum- und Konjugatverdünnungen diente PBS mit 0,08 % Tween 20. Probleme mit unspezifischen Reaktionen in Form einer Hintergrundfärbung traten infolge der Tween 20-Konzentration und der starken Reinigung des Virusmaterials nicht auf.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Virusstämme und Virusvermehrung

3.1.1. Reovirus

Als Ausgangsmaterial für die Reovirus-Vermehrung diente die 3. Berliner Eipassage des Virusstammes 1133 (45). Die Vermehrung des Reovirus erfolgte auf Hühnerembryo-Leberzellkulturen, die nach den üblichen Methoden in Plastik-Petrischalen (Durchmesser 140 mm) gezüchtet wurden. Die Zellen wurden mit 2 ml des 1:100 verdünnten Virusmaterial als pro Schale beimpft und 48 Stunden bebrütet. Anschließend wurde die Kultur geerntet und bei -70°C eingefroren. Für den IF-Test wurde der Virusstamm Reo 25 verwendet.

3.1.2. AAV

Als Ausgangsmaterial für die AAV-Vermehrung diente der embryoadaptierte Virusstamm Tipton B (5). Die Vermehrung des AAV erfolgte in embryonierten Hühnereiern. 11 Tage vorbebrütete embryonierte SPF-Valo-Eier wurden mit 0,2 ml Virusmaterial in die Chorioallantoishöhle beimpft. Am 4. Tag p.i. wurde die Allantoisflüssigkeit von lebenden und abgestorbenen Embryonen geerntet, gepoolt und bei 3000 UpM 10 Minuten zentrifugiert. Das Material wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C eingefroren.

3.2. Virusreinigung und Antigenherstellung

3.2.1. Reovirus

A. Genetron-gereinigtes Zellkulturmaterial

Die Virus-Kultur wurde nach dem Auftauen mit 20 Vol.%

Genetron (1,1,2-Trichlortrifluorethan, Merck, Darmstadt) versetzt, im Ultra-Turrax 1 Minute homogenisiert und bei 4000 UpM 15 Minuten zentrifugiert (Sorvall RC - 5B Refrigerated Superspeed Zentrifuge). Der Überstand wurde erneut mit Genetron versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Die Rückstände der beiden Zentrifugationen wurden in Tris-EDTA-Puffer, pH 7,8 (TE-Puffer) aufgelöst, homogenisiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Material 3mal 2 Stunden gegen TE-Puffer dialysiert und bei -70°C eingefroren.

B. Reinigung durch CsCl-Kissen-Zentrifugation

Das vorgeklärte Zellkulturmaterial (siehe A) wurde auf ein CsCl-Kissen (6 ml CsCl-Lösung Dichte $\rho=1,6\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) geschichtet und 2 Stunden im SW-27-Rotor, Beckman, L5 - 65B, bei 25 000 UpM zentrifugiert. Nach dem ersten Lauf wurde der größte Teil des Überstandes abpipettiert und erneut mit vorgeklärtem Zellkulturmaterial überschichtet. Dies wurde so oft wiederholt, bis alles Material verbraucht war (ca. 3 Läufe). Die letzte Zentrifugation wurde über 12 Stunden bei 25 000 UpM gefädert. Die auf dem CsCl-Kissen entstandene leicht diffuse Virusbande wurde durch seitliches Anstechen der Zentrifugenröhrchen abgezogen, dialysiert und bei -70°C eingefroren.

C. Reinigung durch CsCl-Stufengradienten-Zentrifugation

Das vorgeklärte Zellkulturmaterial (siehe A) wurde auf einen CsCl-Stufengradienten (6 ml CsCl-Lösung Dichte $\rho=1,6\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, darüber 6 ml CsCl-Lösung Dichte $\rho=1,3\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) geschichtet und im SW-27-Rotor zentrifugiert wie unter B beschrieben. Beide über dem CsCl-Gradienten sichtbaren Virusbanden wurden abgezogen, dialysiert und bei -70°C eingefroren.

D. Reinigung durch CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation

Die untere der aus der CsCl-Stufengradienten-Zentrifugation

gewonnenen Banden (siehe C) wurde einer CsCl-Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation unterworfen, die im SW-60-Rotor über 24 Stunden bei 45 000 UpM durchgeführt wurde. Die Virusbande wurde abgezogen, dialysiert und bei -70 °C eingefroren.

Zur Verwendung im ELISA wurde das verschieden stark gereinigte Virusmaterial aufgetaut und mit 0,05 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,7, verdünnt.

3.2.2. AAV

Bei der Reinigung des AAV sollten Adenoviren und AAV optimal getrennt werden.

Die aufgetaute Allantoisflüssigkeit (AF) wurde mit 50 Vol.% Genetron versetzt, 3mal 1 Minute mit dem Ultra-Turrax homogenisiert und 15 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde erneut mit Genetron versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Die Sedimente aus beiden Zentrifugationen wurden in TE-Puffer aufgelöst und zur Extraktion 3mal 1 Minute homogenisiert und 15 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und 2mal mit 25 Vol.% Genetron versetzt, homogenisiert und durch Zentrifugation geklärt. Die nun folgenden Ultra-Zentrifugationen wurden in der gleichen Weise wie bei der Reovirus-Reinigung im CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten durchgeführt (vgl. 3.2.1. D). Eine Antigencharge wurde zum Teil im Anschluß an die erste Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation einer zweiten unterworfen, die wie die erste bei 45 000 UpM über 24 Stunden durchgeführt wurde.

Zur Verwendung im ELISA wurde das wie oben gereinigte Virusmaterial aufgetaut und mit 0,05 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,7, verdünnt.

3.3. Virustitration

Die Infektiositätstiter der verschiedenen Reovirus-Präparationen wurden anhand des Plaque-Tests ermittelt. Hühnerembryo-Fibroblastenkulturen wurden mit 0,2 ml der in Zehnerpotenzen verdünnten Präparationen pro Schälchen (Durchmesser 60 mm) beimpft. Am 5. Tag p.i. wurden die Plaques ausgezählt und die plaque-bildenden Einheiten (PBE) pro ml berechnet.

3.4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der verschiedenen Virus-Präparationen wurde anhand der Methode von SCHAFFNER und WEISSMANN (40) bestimmt.

3.5. Seren

Als Reo- und AAV-negative Kontrollseren wurden Normalseren von SPF-Hühnern unterschiedlichen Alters untersucht. Ein Serum kam von einem 20 Wochen alten Tier, 18 Seren stammten von 6 Wochen alten und 8 Seren von 4 Wochen alten Tieren.

Als positive Kontrollseren für den Reo-ELISA wurden 4 Reo-Hyperimmunseren verwendet, die alle in der AGP eine starke Präzipitation zeigten.

Als positive Kontrollseren für den AAV-ELISA wurden das nur gegen AAV gerichtete Tipton 1-Serum und das gegen AAV und Adenovirus gerichtete Tipton 4-Serum verwendet. Beide zeigten in der AGP eine starke Präzipitation.

Zur Absicherung der Spezifität wurden ferner im Reo- und AAV-ELISA Hyperimmunseren untersucht, die gegen andere Virusarten gerichtet waren (ILT-, Gumboro-, Adeno (CELO)-, IB- und gegebenenfalls Reo- bzw. Tipton-Antiseren)⁺.

⁺ Herrn Prof. Dr. von Bülow, Berlin, danke ich für die Bereitstellung der Hyperimmunseren.

In Reinenuntersuchungen wurden insgesamt 859 Feldseren von 12 bis 54 Wochen alten Hühnern aus 14 verschiedenen Broiler-Elterntierbeständen auf ihren Gehalt an Reo- und AAV-Antikörpern untersucht.

3.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.6.1. Konjugat

Als Konjugat wurde ein in Kaninchen hergestelltes gegen Hühner-IgG gerichtetes Immunglobulin verwendet, das mit dem Enzym Peroxidase konjugiert war (Firma Cappel, Cochranville, USA). Es lag in lyophilisierter Form vor und wurde bei 4 °C gelagert. Nach Auflösung mit 2 ml Aqua dest. pro Ampulle wurde es bei -20 °C eingefroren. Erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurde das Konjugat mit einem Inkubationsmedium (0,5 M Natriumchlorid-Lösung, pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20), das in der bei HERLING (17) angegebenen Weise hergestellt wurde, 1:200 verdünnt.

3.6.2. Substrat

Zur Herstellung des Substratpuffers wurden 0,1 M Zitronensäure und 0,2 M di-Natriumhydrogenphosphat in einem Verhältnis von 1,2:1 miteinander gemischt, so daß ein pH-Wert von 4,5 entstand. Zu 20 ml dieses Puffers wurden 10 mg Ortho-Phenylendiamin (OPD) von der Firma Merck, Darmstadt, und, nach Lösung des OPD, 6 µl 30 % H_2O_2 (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Das Substrat wurde immer erst unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt.

3.6.3. Photometrische Messung

Das Messen der Farbreaktionen erfolgte mit dem Microelisa-Auto-Reader MR 580 von Dynatech. Die ELISA-Platten wurden bei einer Wellenlänge von 490 nm abgelesen.

Es besteht bei dem Gerät die Möglichkeit, alle Extinktionswerte mit einem Faktor (1,1 bis 1,9) multiplizieren zu lassen. Hiermit konnten größere Unterschiede in der Reaktionszeit der Platten ausgeglichen werden.

3.6.4. Durchführung des ELISA

Die Durchführung des indirekten Reo- und AAV-ELISA folgte im Prinzip der von HERLING (17) und HERLING et al. (18) für das IB-Virus beschriebenen Methode.

Die ELISA-Platten (Flachboden-Microelisaplaten der Firma Dynatech, M 129 B) wurden mit dem verdünnten Antigenmaterial (vgl. 3.2.1. und 3.2.2.) beschichtet und für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS, pH 7,4, mit 0,05 % Tween 20 (Miniwash, Dynatech) wurden die Serumverdünnungsreihen in Zweierpotenzen in der Platte erstellt (Inkubationsmedium wie für die Konjugatverdünnung, vgl. 3.6.1.) und 90 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde das Konjugat ebenfalls 90 Minuten inkubiert. Es folgte ein letzter Waschvorgang und die Zugabe des Substrates (vgl. 3.6.2.). Nach einer ungefähr 30minütigen Reaktionszeit im Dunkeln wurden die Extinktionswerte der Proben gemessen (vgl. 3.6.3.). Der genaue Zeitpunkt für die Messung wurde durch Überprüfung des auf jeder Platte mitgeführten positiven Kontrollserums bestimmt. Hatte dieses einen bestimmten Titer erreicht, so wurde die Platte abgelesen. Bei allen vier Reaktionsschritten wurde mit Mengen von 50 µl pro Kavität gearbeitet.

3.7. Agar-Gel-Präzipitation (AGP)

Die AGP wurde in Kulturschälchen (Durchmesser 60 mm) durchgeführt. Als Agar wurde in Veronalpuffer (pH 7,2) gelöster 1 %iger Agar Noble (Difco Laboratories) verwendet. Als Reovirus-Antigen diente homogenisierte Chorioallantois-membran (CAM) von Eiern, die mit Reovirus 1133 infiziert worden waren (4).

Als AAV-Antigen diente zweimal im CsCl-Gleichgewichtsgradienten gereinigtes Virusmaterial (vgl. 3.2.2.). So war gewährleistet, daß keine durch Adenovirus-Partikel hervorgerufenen falsch positiven Ergebnisse entstanden. Das Virusmaterial wurde 1:3 in PBS verdünnt.

Das Auftreten von Präzipitationslinien wurde nach 1, 2 und 3 Tagen überprüft.

3.8. Indirekter Immunofluoreszenz-Test (IF-Test)

3.8.1. Reovirus

Der IF-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren wurde nach Angaben von BÜLOW (4) durchgeführt.

Eintägige primäre Embryo-Fibroblasten-Deckglaskulturen wurden mit 5×10^4 PBE des Virusstammes Reo 25 pro Kulturschälchen (Durchmesser 60 mm) beimpft und 24 Stunden später in Aceton fixiert. Nach dem Trocknen wurden sie bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Deckgläschen mit den 1:20 in PBS verdünnten Seren betropft und 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach 2mal 10minütigem Waschen in PBS auf dem Magnetrührer wurden die Deckgläser mit Konjugat (F.I.T.C. Conjugated Anti-Chicken-IgG from rabbit, Miles Laboratories, Israel), 1:30 verdünnt, beschichtet und wiederum 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Einbettung der Deckgläser auf Objektträgern in

Glyzerin-Phosphatpuffer und die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar). Als positiv wurden die Präparate angesehen, bei denen es zu einer spezifischen intrazytoplasmatischen Fluoreszenz kam.

3.8.2. AAV

Dreitägige primäre Nierenzell-Deckglaskulturen wurden mit 0,2 ml Impfmateriel pro Kulturschälchen (Durchmesser 60 mm) beimpft und 24 Stunden später in Aceton fixiert. Als Impfmateriel wurde der Virusstamm Tipton B, 1:5 verdünnt, bzw. durch einmalige CsCl-Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation gereinigtes AAV-Virusmateriel (vgl. 3.2.2.), 1:2,5 verdünnt, verwendet. Die Deckgläser wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

Die Durchführung des Tests erfolgte im Prinzip nach der für das Reovirus beschriebenen Methode (vgl. 3.8.1.). Vor der Inkubation der Hühnerseren wurden die Deckgläser jedoch für 30 Minuten mit einem Antiserum gegen aviäre Adenoviren vom Kaninchen beschichtet. Ferner erfolgten alle Waschvorgänge 3mal über 10 Minuten.

3.9. Virusneutralisationstest (VNT)

Der VNT zum Nachweis von Antikörpern gegen Adenoviren erfolgte nach der Mikrotitermethode. Gleiche Mengen Serum und Impfmateriel (100 ID / 50 µl) wurden 2 Stunden bei 38 °C in der Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden die Embryo-Leberzellen in 50 µl Kulturmedium zugefügt. Nach fünftägiger Inkubation bei 38 °C wurden die Platten mit Formalin fixiert und gefärbt (Giemsa) (32).

3.10. Immunisierungsversuch

Vier Legehennen (SPF-Valo) wurden im Alter von 20 Wochen mit 0,2 ml Tipton B - Virus intraokulär und nasal infiziert und anschließend 12 Wochen in einem Stahlisolator gehalten. Wöchentlich wurde durch Punktion der Flügelvene von jedem Tier Serum gewonnen, um den Verlauf der Antikörperbildung zu überprüfen.

4. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1. Untersuchung verschiedener Antigen-Präparationen auf ihre Verwendbarkeit im ELISA

4.1.1. Reo-ELISA

Es sollte ein optimales Antigen für den reo-ELISA gefunden werden. Unterschiedlich noch gereinigte Virus-Präparationen wurden als Antigene geprüft.

Die Abbildungen 1 bis 4 zeigen die Serumverdünnungsreihen eines positiven und eines negativen Referenzserums, wobei als Antigen vorgeklärtes (Abb. 1), auf ein CsCl-Kissen sedimentiertes (Abb. 2), im CsCl-Stufengradienten gereinigtes (Abb. 3) bzw. im CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten gereinigtes (Abb. 4) Virusmaterial verwendet wurde.

wie Abbildung 1 zeigt, waren die Differenzen der Extinktionswerte beider Seren bei der Verwendung von nur vorgeklärtem Virusmaterial als Antigen (vgl. 3.2.1. A) viel zu gering, als daß positive und negative Seren eindeutig natten unterschieden werden können.

Das aus der CsCl-Kissen-Zentrifugation gewonnene Material (vgl. 3.2.1. B) ergab, wie Abbildung 2 zeigt, bereits größere Differenzen. Sie reichten jedoch nicht aus, um auch schwach positive Seren als positiv zu erkennen. Ferner störten der rasche Abfall der Kurve des positiven Serums sowie der immer noch hohe Extinktionswert des negativen Serums in der Verdünnung 1:40.

Bei der Untersuchung der beiden Banden aus der CsCl-Stufengradienten-Zentrifugation (vgl. 3.2.1. C) auf Dichte, Gehalt an intakten Viruspartikeln und Brauchbarkeit als Antigen für den ELISA stellte sich heraus, daß die untere Bande der Schwimmdichte des Reovirus entspricht und den größeren Anteil an intakten Viruspartikeln besitzt. Bei Verwendung dieser Bande als Antigen für den ELISA zeigen sich weit bessere Ergebnisse (vgl. Tab. 1).

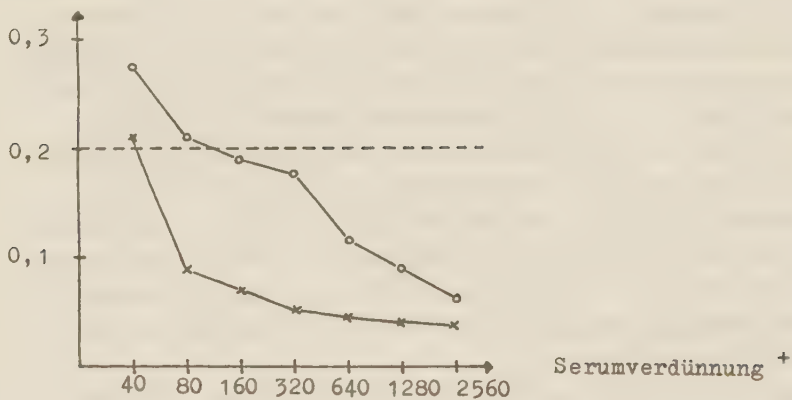
Abbildung 1

Serum-Titration im Reo-ELISA

Antigen: vorgeklärtes Virusmaterial

Proteingehalt: 1000 µg/ml

Extinktion



+ Reziproke Werte

○—○ Reo-Hyperimmunserum

×—× Reo-negatives Kontrollserum (SPF)

Abbildung 2

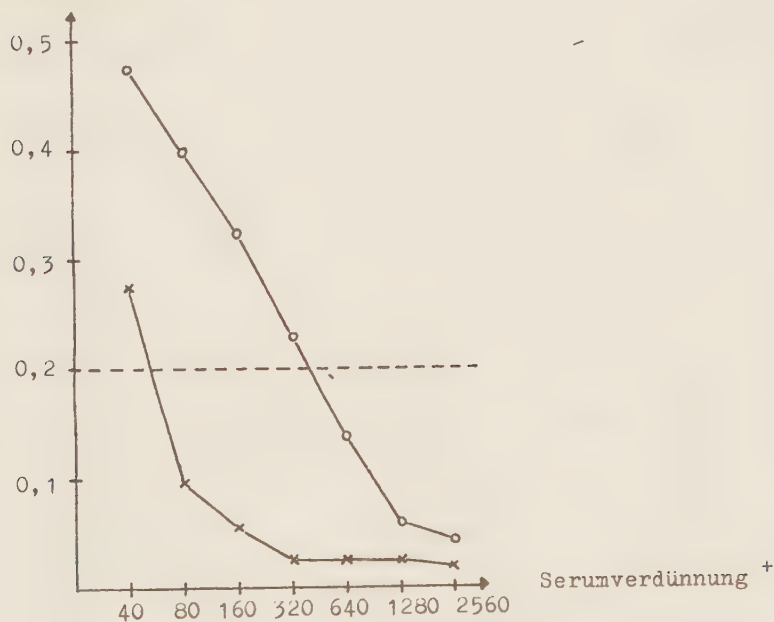
Serum-Titration im Reo-ELISA

Antigen: durch CsCl-Kissen-Zentrifugation gereinigtes

Virusmaterial, 1:5 verdünnt

Proteingehalt: 70 µg/ml

Extinktion



+ Reziproke Werte

○—○ Reo-Hyperimmunserum

×—× Reo-negatives Kontrollserum (SPF)

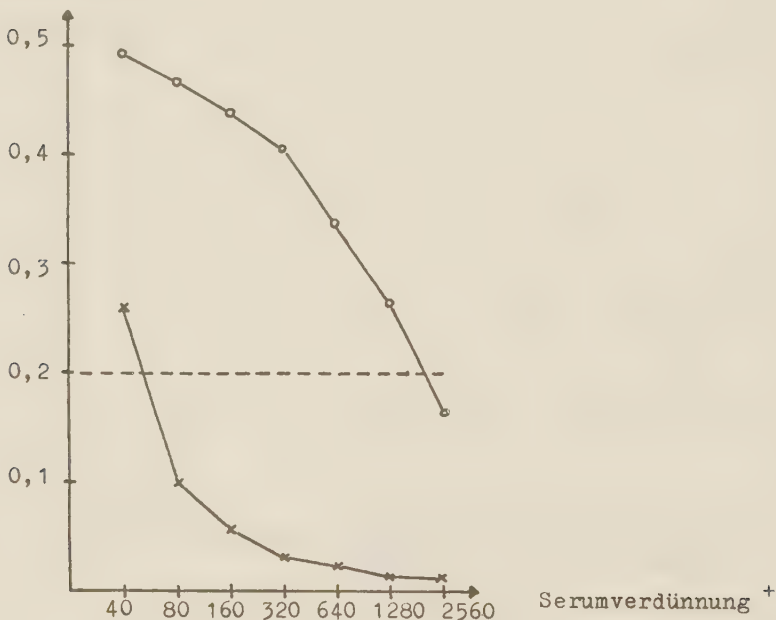
Abbildung 3

Serum-Titration im Reo-ELISA

Antigen: durch CsCl-Stufengradienten-Zentrifugation
gereinigtes Virusmaterial, 1:10 verdünnt

Proteingehalt: 30 µg/ml

Extinktion



+ Reziproke Werte

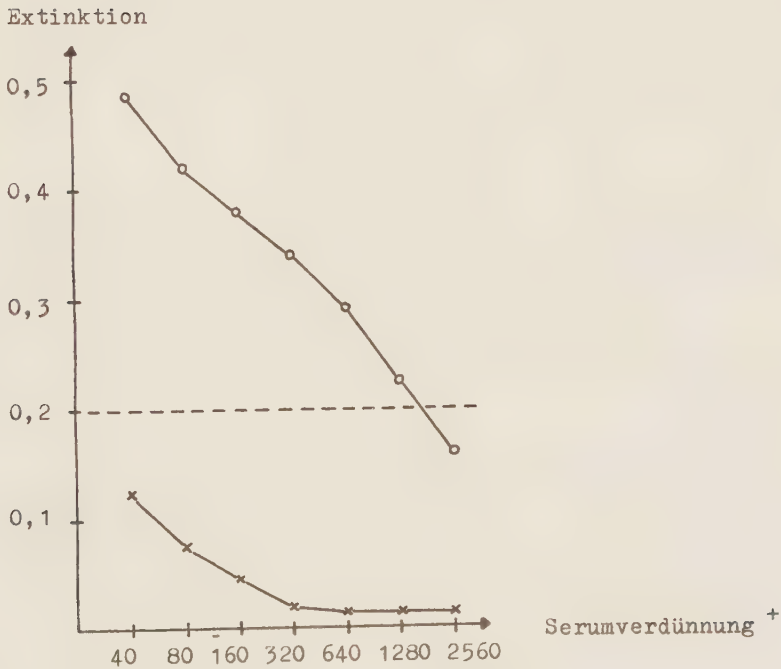
- Reo-Hyperimmunserum
- ×—× Reo-negatives Kontrollserum (SPF)

Abbildung 4

Serum-Titration im Reo-ELISA

Antigen: durch CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten-
Zentrifugation gereinigtes Virusmaterial,
1:200 verdünnt

Proteingehalt: 0,5 µg/ml



+ Reziproke Werte

○—○ Reo-Hyperimmunserum

×—× Reo-negatives Kontrollserum (SPF)

Tabelle 1

Vergleich der oberen und unteren Virusbande aus der CsCl-Stufengradienten-Zentrifugation

Virusbande	Dichte $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	PBE / ml	Ergebnisse im ELISA
obere Bande	1,281	$2,0 \times 10^4$	schlechter
untere Bande	1,368 ⁺	$3,3 \times 10^7$	besser

⁺ Schwimmdichte des Reovirus: 1,360

Wie Abbildung 3 zeigt, waren die Differenzen zwischen den Extinktionswerten beider Seren bei Verwendung dieser unteren Bande als Antigen wesentlich größer als bei Verwendung von weniger stark gereinigtem Virusmaterial. Störend blieb jedoch der hohe Extinktionswert des negativen Serums in der Verdünnung 1:40.

Eine weitere Reinigung des Antigens durch eine CsCl-Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation (vgl. 3.2.1. D) hatte einen deutlichen Abfall des Extinktionswertes des negativen Serums in der Verdünnung 1:40 und damit eine weitere Erhöhung der Spezifität zur Folge (siehe Abb. 4).

Wie die Abbildungen 1 bis 4 zeigen, erhöhen sich durch die Abnahme des Fremdproteingehaltes mit zunehmenden Reinigungsschritten die Spezifität und Sensibilität des ELISA. Dies drückt sich in einer Vergrößerung der Differenzen der Extinktionswerte von positivem und negativem Serum aus.

Der Proteingehalt und die mögliche Verdünnung der einzelnen Präparationen sind in Tabelle 2 dargestellt. Durch Abnahme des Fremdproteingehaltes erhöhte sich die Spezifität mit zunehmenden Reinigungsschritten. Das höher gereinigte

Material konnte wegen seines größeren Reinheitsgrades um ein Vielfaches stärker verdünnt werden. So konnte Material, das im CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten gereinigt worden war, 20mal so stark verdünnt werden wie eine nur im CsCl-Stufengradienten gereinigte Präparation.

Tabelle 2

Proteingehalt und mögliche Verdünnung verschiedener Reovirus-Präparationen als Antigen für den ELISA

Präparationen		Protein= gehalt/ml	mögliche Verdünnung	Bemerkungen
vorgeklärtes Zellkultur= material		1000 µg	/	Material unbrauchbar als ELISA-Anti= gen
auf ein CsCl- Kissen sedimen= tiertes Material		350 µg	max. 1:5	Ergebnis unbefriedigend
im CsCl- Stufengrad. gereinigtes Material (untere Bande)	Charge 1	300 µg	1:10	Ergebnis unbefriedigend
	Charge 2	240 µg	1:5	Ergebnis unbefriedigend
	Charge 3	280 µg	1:10	Ergebnis unbefriedigend
im CsCl- Stufen- u. Gleichge= wichtsgrad. gereinigtes material	Charge 1	93 µg	1:200	Ergebnis gut
	Charge 2	82 µg	1:200	Ergebnis gut

Für alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde daher im Stufen- und Gleichgewichtsgradienten gereinigtes Antigen verwendet.

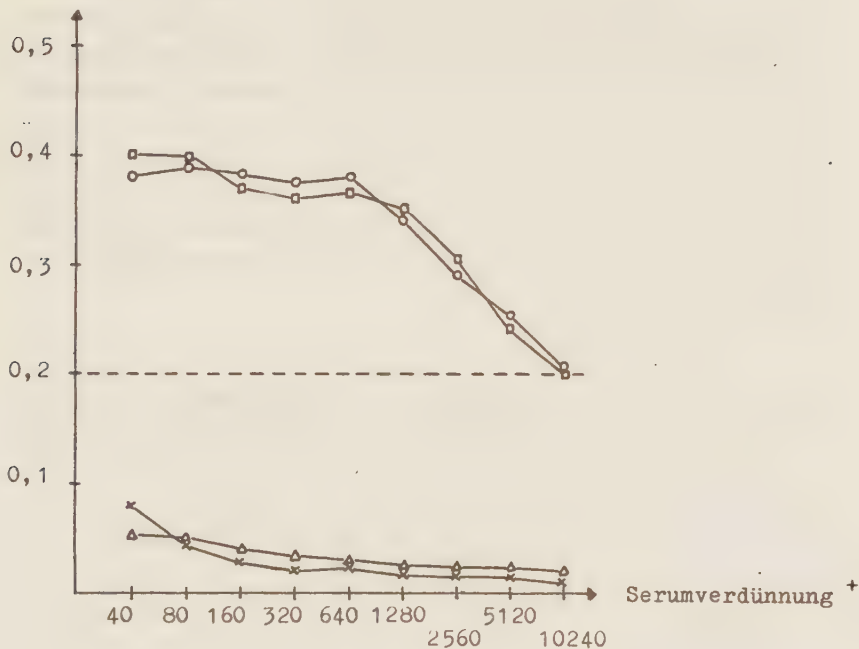
4.1.2. AAV-ELISA

Da das AAV nur zusammen mit Adenoviren vermehrt werden kann, war es nötig, beide Viren optimal zu trennen, bevor das AAV als Antigen im ELISA verwendet werden konnte. Eine weitgehende Trennung des AAV von Adenoviren war nur durch eine CsCl-Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation zu erreichen. Um festzustellen, ob eine zweifache Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation gegenüber einer einfachen eine Erhöhung der Spezifität des ELISA mit sich brachte, wurde einmal und zweimal im Gleichgewichtsgradienten gereinigtes Virusmaterial als Antigen im ELISA getestet (vgl. 3.2.2.). Abbildung 5 zeigt, daß die Differenzen der Extinktionswerte von positivem und negativem Serum bei beiden Antigenen gleich groß waren. Eine zweite Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation erhöhte also nicht die Spezifität des ELISA.

Abbildung 5

Serum-Titration mit unterschiedlichen Virus-Präparationen
als Antigen im AAV-ELISA

Extinktion



+ Reziproke Werte

Antigen: 1mal im CsCl-Gleichgewichtsgradienten gereinigtes
Virusmaterial

- Tipton-Serum, 1:10 mit Normalserum verdünnt
- x—x AAAV-negatives Kontrollserum (SPF)

Antigen: 2mal im CsCl-Gleichgewichtsgradienten gereinigtes
Virusmaterial

- Tipton-Serum, 1:10 mit Normalserum verdünnt
- △—△ AAAV-negatives Kontrollserum (SPF)

Für alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde einmal im CsCl-Gleichgewichtsgradienten gereinigtes Antigen verwendet.

Tabelle 3 gibt den Proteingehalt von drei Antigenchargen und ihre mögliche Verdünnung an. Es fällt auf, daß die Charge mit dem höchsten Proteingehalt am stärksten verdünnt werden konnte. (3. Charge). Es muß sich bei diesem hochgereinigten Material also überwiegend um spezifisches Virusprotein handeln.

Tabelle 3

Proteingehalt und mögliche Verdünnung verschiedener AAV-Präparationen

Präparation	Protein= gehalt/ml	mögliche Verdünnung
Charge 1	44,5 µg	1:200
Charge 2	45,5 µg	1:200
Charge 3	90,0 µg	1:600

4.2. Festlegung der Unterscheidungsgrenze zwischen positiven und negativen Seren und Überprüfung der Spezifität beider ELISA-Systeme

Um positive und negative Seren voneinander unterscheiden zu können, wurde ein bestimmter Extinktionswert als Grenzwert festgesetzt. Hierfür wurden 27 Normalseren und einige gegen andere Virusarten gerichtete Hyperimmunseren (vgl. 3.5.) im Reo- und AAV-ELISA untersucht.

Wie Tabelle 4 zeigt, blieben im AAV-ELISA alle untersuchten Seren (auch die Adeno-Seren) in der Verdünnung 1:40 unter einem Extinktionswert von 0,170. Als Grenzwert wurde daher eine Extinktion von 0,200 festgesetzt.

Tabelle 4

Extinktionswerte von Normalseren und gegen andere Virusarten gerichteten Hyperimmunseren im AAV-ELISA

Seren	Min.-wert	Max.-wert	Mittelwert
Normalseren	0,054	0,092	0,054
Hyperimmunseren ⁺	0,080	0,164	0,118

⁺ ILT-, Gumboro-, CELO-, IB- und Reo-Antiseren

Anzahl der Seren:

Normalseren: 27

gegen andere Virusarten gerichtete Hyperimmunseren: 9

Bei der Untersuchung der Hyperimmunseren im Reo-ELISA zeigte sich, daß die ILT-Seren erheblich höhere Extinktionswerte hervorriefen als die übrigen Hyperimmunseren. Da sie aus einer mit Reovirus infizierten Herde stammten und im IF-Test mit Reovirus ebenfalls positiv reagierten (VON BÜLOW, mündliche Mitteilung), wurde die positive Reaktion im ELISA als spezifisch gewertet. Die ILT-Seren wurden daher nicht mit als Kontrollseren verwendet.

Die Normalseren sowie alle übrigen Hyperimmunseren blieben in der Verdünnung 1:40 unter einem Extinktionswert von 0,170 (siehe Tab. 5). Als Grenzwert wurde daher wie für den AAV-ELISA eine Extinktion von 0,200 festgesetzt.

Tabelle 5

Extinktionswerte von Normalseren und gegen andere Virusarten gerichteten Hyperimmunseren im Reo-ELISA

Seren	Min.-Wert	Max.-Wert	Mittelwert
Normalseren	0,052	0,167	0,087
Hyperimmunseren ⁺	0,120	0,160	0,140

⁺ Gumboro-, CEL0-, IB- und Tipton-Antiseren

Anzahl der Seren:

Normalseren: 27

gegen andere Virusarten gerichtete Hyperimmunseren: 5

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen Serumverdünnungsreihen von jeweils drei negativen und einem positiven Serum im Keo- und AAV-ELISA. Bei beiden ELISA-Systemen zeigte sich deutlich, daß die gegen andere Virusarten gerichteten Hyperimmunseren höhere Extinktionswerte hervorriefen als die Normalseren. In beiden ELISA-Systemen wurden Seren, die in der Verdünnung 1:40 Extinktionswerte von 0,200 und mehr erzeugten, als positiv gewertet. Lag der Extinktionswert in der Verdünnung 1:40 unter 0,200, galt das Serum als negativ.

Um die Spezifität jeder neuen Antigencharge zu überprüfen, wurden jeweils nach Ermittlung der optimalen Verdünnung mehrere bekannte positive und negative Seren untersucht, wobei sich die negativen Seren aus Normalseren und Hyperimmunseren zusammensetzten. Außerdem wurde auf jeder ELISA-Platte ein positives und ein negatives Kontrollserum mitgeführt.

Da AAV-Antiseren stets auch Adenovirus-Antikörper enthalten, sollte der AAV-ELISA speziell auf seine Spezifität in dieser Hinsicht geprüft werden. Hierfür standen 67 Feldseren von 12 bis 54 Wochen alten Hühnern aus 8 Beständen zur Verfügung, die im VNT auf Antikörper gegen Adenoviren untersucht und gegen alle 11 Serotypen des Adenovirus für positiv befunden worden waren. Sie wurden im AAV-ELISA in mehreren Verdünnungen untersucht. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, reagierten ca. zwei Drittel der Seren negativ gegenüber AAV, so daß angenommen werden konnte, daß es zu keiner Reaktion der Adenovirus-Antikörper mit dem Antigenmaterial gekommen war.

Tabelle 6

AAV-Antikörpertiter von 67 gegen alle Serotypen des Adenovirus positiven Feldseren

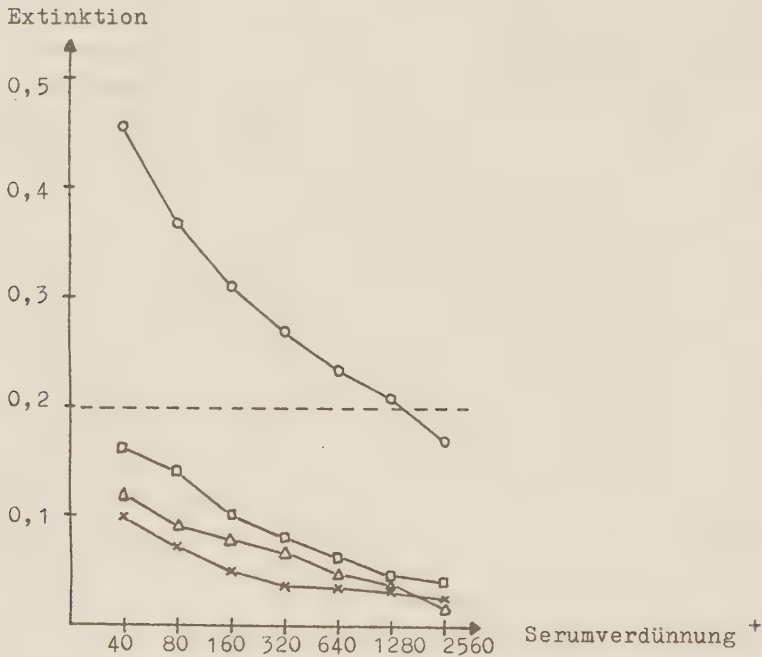
ELISA-Titer	negativ	1:40	1:80	1:160	1:320
Anzahl der Seren	44	13	5	2	3

Abbildung 6

Serum-Titration im Reo-ELISA

Antigen: durch CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten-
Zentrifugation gereinigtes Virusmaterial,
1:200 verdünnt

Proteingehalt: 0,5 µg/ml



+ Reziproke Werte

- Reo-Hyperimmunserum
- CEIO-Hyperimmunserum
- △—△ IB-Hyperimmunserum
- ×—× Normalserum

Abbildung 7

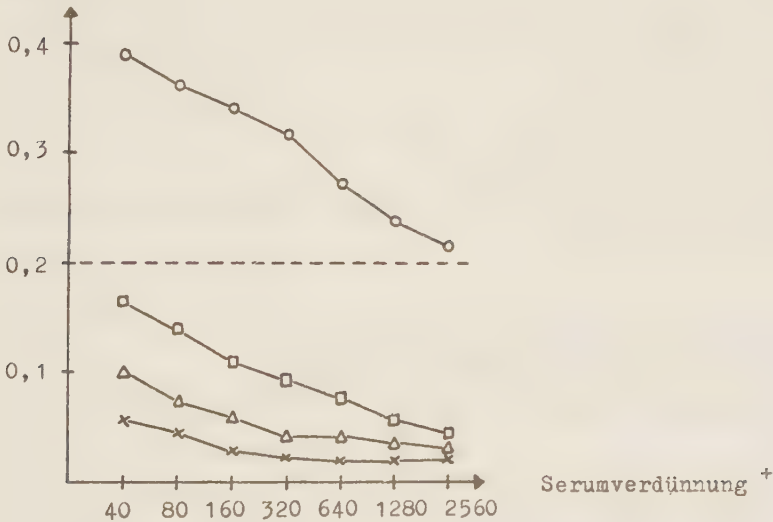
Serum-Titration im AAVV-ELISA

Antigen: 1 mal im CsCl-Gleichgewichtsgradienten gereinigtes

Virusmaterial, 1:600 verdünnt

Proteingehalt: 0,15 µg/ml

Extinktion



+ Reziproke Werte

○—○ Tipton-Hyperimmunserum, 1:10 mit Normalserum vorverdünnt

□—□ CELO-Hyperimmunserum

△—△ IB-Hyperimmunserum

x—x Normalserum

4.3. Sensibilität der ELISA-Systeme

4.3.1. Reo-ELISA

4.3.1.1. Vergleich der Sensibilität von ELISA, AGP und IF-Test

Aus einer Reihe im ELISA untersuchter Feldseren wurden 10 schwach positive (Titer 1:40, 1:80) und 10 stark positive (Titer 1:320) ausgewählt und in der AGP und im IF-Test untersucht (vgl. 3.7. und 3.8.1.). Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, zeigten die im ELISA stark positiven Seren in der AGP eine deutliche Präzipitation, während die schwach positiven teils gar keine, teils nur sehr feine Präzipitationslinien bildeten, die zudem nur infolge einer Verstärkung durch ein jeweils direkt benachbart aufgetragenes stark präzipitierendes Serum zu erkennen waren.

Wie weiter aus Tabelle 7 hervorgeht, reagierten alle Seren im IF-Test positiv.

Tabelle 7

Vergleich der Sensibilität von ELISA, AGP und IF-Test zum Nachweis von Reo-Antikörpern

Seren	AGP		IF-Test		Anzahl
	negativ	positiv	negativ	positiv	
im ELISA schwach pos. Titer: 1:40, 1:80	6	4	0	10	10
im ELISA stark pos. Titer: 1:320	0	10	0	10	10

Weitere Ergebnisse über den Vergleich der Sensibilität von ELISA und IF-Test ergeben sich aus 4.3.1.2.

4.3.1.2. Vergleich der Sensibilität und der Titer von ELISA und IF-Test

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen standen 208 Feldseren zur Verfügung, die im IF-Test auf Reo-Antikörper untersucht worden waren. Die Seren stammten von 20 bis 60 Wochen alten Hühnern aus verschiedenen Herden. Sie wurden in einer Verdünnung von 1:40 im ELISA getestet und als positiv bzw. negativ beurteilt. Wie Tabelle 8 zeigt, ergaben fast alle im IF-Test positiv reagierenden Seren auch im ELISA positive Ergebnisse. Von den im IF-Test negativen Seren reagierten ein Sechstel im ELISA positiv.

Tabelle 8

Vergleich der Sensibilität von ELISA und IF-Test zum Nachweis von Reo-Antikörpern

Seren	ELISA		Anzahl
	positiv	negativ	
im IF-Test pos.	114	4	118
im IF-Test neg.	15	75	90

Diejenigen Seren, die im IF-Test negativ, im ELISA jedoch positiv reagiert hatten, wurden in weiteren Verdünnungen untersucht, um inra Titer zu ermitteln. Wie Tabelle 9 zeigt, waren 14 der 15 Seren schwach positiv (Titer 1:40, 1:80), nur ein Serum war stark positiv (Titer 1:320).

Tabelle 9

Reo-Antikörpertiter von 15 im IF-Test negativ und im ELISA positiv reagierenden Feldseren

ELISA-Titer	1:40	1:80	1:160	1:320
Anzahl der Seren	10	4	0	1

In einer weiteren Untersuchung sollten die ELISA-Antikörpertiter mit denen des IF-Tests verglichen werden. Hierzu wurden 5 Reo-Seren (2 Feldseren und 3 Hyperimmunseren) im ELISA und IF-Test in einer Zweier-Verdünnungsreihe untersucht und ihre Titer bestimmt. Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, lagen die mit dem IF-Test erreichten Titer um 1 bis 2 Verdünnungsstufen höher als die mit dem ELISA erreichten. Als Titer im IF-Test wurde die Verdünnungsstufe angesehen, bei der gerade noch eine spezifische Fluoreszenz zu erkennen war. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß die Beurteilung der Fluoreszenz in der Endverdünnung immer nur subjektiv sein kann, während die Ermittlung des Titers im ELISA objektiv durch Ablesen der Extinktionswerte erfolgt.

Tabelle 10

Vergleich der im ELISA und IF-Test ermittelten Antikörpertiter von 5 Seren

Serum	Titer im ELISA	Titer im IF-Test
1	1:80	1:160
2	1:520	1:640
3	1:1280	1:5120
4	1:2560	1:10 240
5	1:1280	1:5120

Serum 1: Feldserum 1

Serum 2: Feldserum 2

Serum 3: Reo-Hyperimmunserum 1

Serum 4: Reo-Hyperimmunserum 2

Serum 5: Reo-Hyperimmunserum 3

4.3.2. AAV-ELISA

4.3.2.1. Vergleich der Sensibilität von ELISA und AGP

Aus einer Reihe im ELISA untersuchter Feldseren wurden 10 negative, 10 schwach positive (Titer 1:40, 1:80) und 10 stark positive (Titer 1:160, 1:320) ausgewählt und zusammen mit den Tipton-Seren 1 und 4 und einem CELÖ-Hyperimmunserum in der AGP untersucht (vgl. 3.7.). Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, zeigte keines der 30 Feldseren eine Präzipitation, ebenso reagierte das zur Kontrolle mitgeführte CELÖ-Hyperimmunserum negativ. Die beiden Tipton-Seren zeigten eine starke Präzipitation. Ihre Titer im ELISA lagen bei 1:10 240 (Tipton 1) und 1:5120 (Tipton 2).

Tabelle 11

Vergleich der Sensibilität von ELISA und AGP zum Nachweis von AAV-Antikörpern

	AGP		Anzahl der Seren
	positiv	negativ	
im ELISA negative Seren	0	10	10
im ELISA schwach pos. Seren (Titer 1:40, 1:80)	0	10	10
im ELISA stark pos. Seren (Titer 1:160, 1:320)	0	10	10
Tipton-Seren	2	0	2
CELÖ-Hyperimmunserum	0	1	1

4.3.2.2. IF-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen AAAV

Da das AAAV sich nur in Anwesenheit von Adenoviren vermehren kann, mußte das Impfmateriel neben AAAV auch Adenovirus-Partikel enthalten.

Um eine durch Adenovirus-Antikörper ausgelöste Fluoreszenz zu verhindern, wurde versucht, das Adenovirus-Antigen vor der Inkubation der Hühnerseren mit einem Antiserum gegen aviäre Adenoviren vom Kaninchen zu blockieren. Anschließend wurden die zu untersuchenden Hühnerseren aufgetragen. Das verwendete Konjugat war in Kaninchen hergestellt und gegen Hühner-IgG gerichtet, so daß es nur mit Antikörpern aus Hühnerseren reagierte.

In ersten Versuchen wurde als Impfmateriel 1:5 verdünntes Virus (Tipton B) verwendet (vgl. 3.8.2.). Wie Tabelle 12 zeigt, reagierten die AAAV-Seren stark positiv, das SPF-Serum zeigte keine Fluoreszenz. Ebenfalls deutlich positiv reagierte jedoch auch das gegen AAAV negative Adeno-Antiserum.

In weiteren Versuchen wurden die Deckgläser mit einmal im CsCl-Gleichgewichtsgradienten gereinigtem AAAV beimpft. Erfahrungsgemäß enthält derart gereinigtes AAAV noch genügend Adenovirus-Partikel, die eine Helferfunktion bei der Vermehrung ausüben können (BAUER, mündliche Mitteilung). Auf diese Weise sollte der Gehalt der Kultur an Adenoviren verringert werden. Wie Tabelle 12 zeigt, kam es jedoch auch in diesen Kulturen nach Absättigung mit dem hochtitrigen Adeno-Antiserum vom Kaninchen weiterhin zu einer Fluoreszenz durch das Adeno-Antiserum vom Huhn.

Auffällig war, daß das Hühner-Adeno-Serum deutlich matter fluoreszierte als die Tipton-Seren. Zum Vergleich wurden in einem weiteren Versuch die Deckgläser direkt mit dem Hühner-Adeno-Serum beschichtet ohne vorherige Inkubation eines Kaninchen-Adeno-Serums. Hier kam es zu einer erheblich brillanteren Fluoreszenz.

Tabelle 12

IF-Test zum Nachweis von Antikörpern gegen AAV

Hühner- Antiserum*	Impfmaterial	
	Tipton B, 1:5 verdünnt	gereinigtes AAV**
Tipton 1	+ + +	+ +
Tipton 4	+ + +	+ +
CELO -Serum***	+ +	+
SPF-Serum	-	-

* Seren 1:40 verdünnt

** Reinigung durch einmalige CsCl-Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation

*** im ELISA negativ gegen AAV

Blockade der Adenovirus-Partikel durch ein Antiserum gegen aviäre Adenoviren vom Kaninchen

Konjugat: Kaninchen-Anti-Huhn, 1:30 verdünnt

Es gelang nicht, mit dem hier gezeigten Vorgehen die Adenovirus-Antigene in der Präparation völlig abzusättigen. Der IF-Test ist daher für einen routinemäßigen AAV-Antikörpernachweis in Feldseren, die Adenovirus- und AAV-Antikörper enthalten, nicht brauchbar.

4.4. Titerverlauf nach Infektion mit AAV und Adenovirus

Um den Verlauf der Antikörperbildung nach Infektion mit AAV und Adenovirus zu verfolgen, wurden die wöchentlich von den infizierten Tieren gewonnenen Seren (vgl. 3.9.) im ELISA auf Antikörper gegen AAV und im VNT auf Antikörper gegen Adenoviren untersucht.

Wie aus Tabelle 13 hervorgent, waren bereits nach einer Woche p.i. alle 4 Tiere im AAV-ELISA positiv. Die Serumtiter stiegen bis zur 5. bzw. 6. Woche weiter an und bildeten dann bis zum Versuchsende in der 12. Woche ein Plateau. Bei den Tieren 2 und 4 lag das Plateau bei der Titerstufe 1:1280, bei Tier 1 bei 1:640, während bei Tier 3 das Plateau nur die Titerstufe 1:160 erreichte.

Die Neutralisationstiter der Adenovirus-Antikörper wurden anhand der Methode von REED und MUENCH (38) aus je 4 bzw. 8 Reaktionen errechnet. Antikörper gegen Adenoviren waren ebenfalls schon eine Woche p.i. bei allen 4 Tieren im VNT nachzuweisen (vgl. Tab. 14). Bei Tier 1, 3 und 4 stiegen die Serumtiter bis zur 8. Woche p.i. an, fielen zur 9. Woche erheblich ab und stiegen zur 12. Woche wiederum an. Tier 2 unterschied sich von den anderen Tieren dadurch, daß der Titerabfall schon zur 8. Woche p.i. erfolgte. Anschließend stieg der Titer wie bei den anderen Tieren erneut an.

Abbildung 8 zeigt den mittleren Titerverlauf der AAV- und Adenovirus-Antikörper. Der mittlere AAV-Antikörpertiter stieg bis zur 6. Woche p.i. stetig an, wobei der Anstieg bis zur 2. Woche steil und anschließend flacher verlief. Nach der 6. Woche p.i. bis zum Ende des Versuches in der 12. Woche bildete sich ein Plateau bei einem mittleren Titer von 1:640.

Der mittlere Adenovirus-Antikörpertiter stieg kontinuierlich bis zur 8. Woche p.i. an, wobei der maximale Titer in der 8. Woche bei 1:1526 lag. Es folgten ein Titerabfall zur 9. Woche auf 1:252 und ein erneuter Anstieg bis zum Versuchsende in der 12. Woche.

Tabelle 13

AAAV-Antikörpertiter von 4 artifiziell infizierten Tieren
im ELISA

Wochen p.i.	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	GMT
1	80 +	80	80	40	67
2	320	320	160	320	269
3	320	320	320	320	320
4	320	640	160	640	381
5	640	640	160	1280	538
6	640	1280	160	1280	640
7	640	1280	160	1280	640
8	640	1280	160	1280	640
9	640	1280	160	1280	640
10	640	1280	160	1280	640
11	640	1280	160	1280	640
12	640	1280	160	1280	640

+ Reziproke Werte der Serumverdünnungen

Tabelle 14

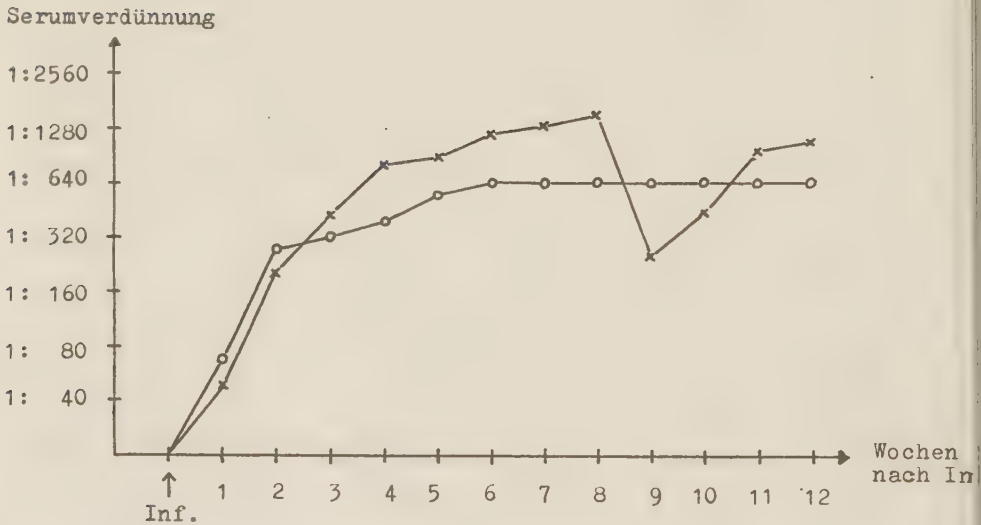
Adenovirus-Antikörpertiter von 4 artifiziell infizierten Tieren im VNT (4 bzw. 8 Reaktionen pro Serum)

Wochen p.i.	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	GMT
1	105 ⁺	56	22	41	48
2	160	360	112	240	198
3	240	724	724	240	417
4	339	1738	640	1072	797
5	537	1820	537	1096	871
6	955	1660	708	1622	1162
7	891	2344	977	1413	1303
8	1280	1280	1820	1820	1526
9	160	891	89	320	252
10	224	1618	224	447	436
11	1618	1820	320	891	957
12	640	2560	447	1618	1043

⁺ Reziproke Werte der Serumverdünnungen

Abbildung 8

Verlaufskurven der mittleren AAV-Antikörpertiter (ELISA) und der mittleren Adenovirus-Antikörpertiter (VNT) von 4 artifiziell infizierten Tieren



○—○ AAV-Antikörpertiter (GMT)

×—× Adenovirus-Antikörpertiter (GMT)

4.5. Verbreitung von Reovirus- und AAV-Infektionen in Elterntierbeständen

-
Für Reihenuntersuchungen sollte zunächst geprüft werden, ob neben Einzelseren auch gepoolte Seren in die Untersuchung mit einbezogen werden konnten. Es wurden 169 Einzelseren aus 3 Herden, die jeweils zum selben Zeitpunkt gewonnen worden waren, im Reo- und AAV-ELISA untersucht, um festzustellen, wie die Titer in einer Herde zu einem bestimmten Zeitpunkt verteilt waren. Die Abbildungen 9 und 10 stellen die Titerverteilungen der auf Reo- und AAV-Antikörper untersuchten Einzelseren aus 3 Herden dar. Es zeigte sich, daß der Schwerpunkt der Verteilung jeweils auf 1 bis 3 Titerstufen lag, während zu höheren bzw. niedrigeren Titerstufen hin die Anteile geringer wurden.

Bei den Herden I und K lag der Schwerpunkt der Reo-Serumtiter bei 1:80 und 1:160 (ca. 70 % der Seren). Bei der Herde D hingegen waren die Titer niedriger, 36 % der Seren waren negativ, 54 % erreichten Titer von 1:40 bzw. 1:80. Nur 9 % der Seren wiesen einen Titer von 1:160 auf.

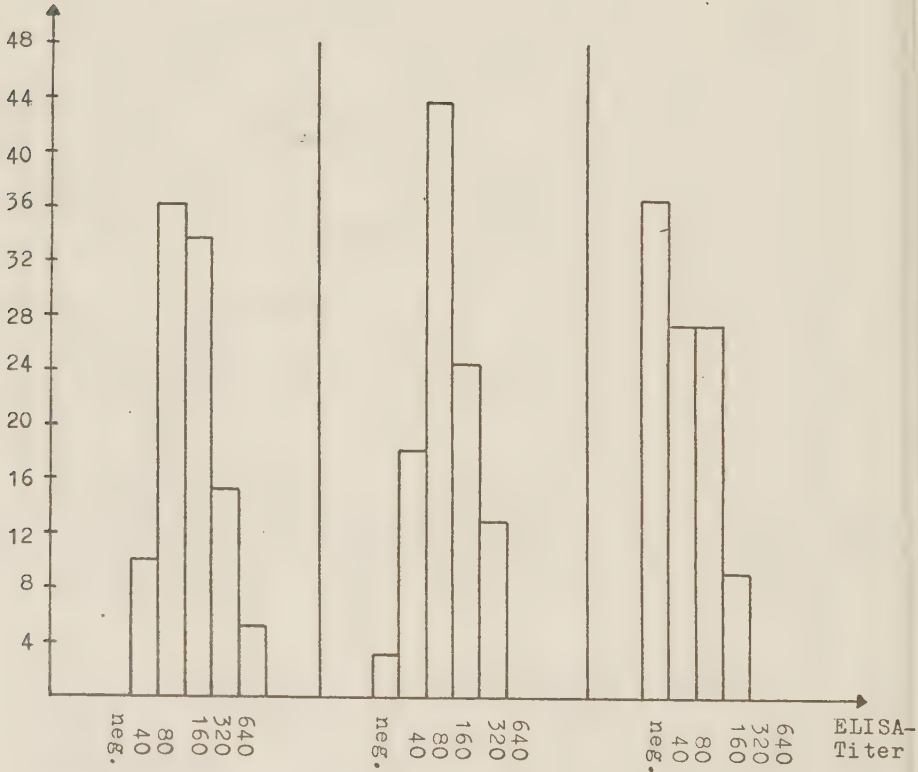
Hinsichtlich der AAV-Serumtiter glichen sich die Herden K und D. Bei beiden Herden waren über 60 % der Seren negativ. In der Herde I waren dagegen nur 24 % der Seren negativ, der Titer-Schwerpunkt lag in dieser Herde bei 1:40 und 1:80 (64 % der Seren).

Es kann angenommen werden, daß die Einzelseren, aus denen sich ein Serumpool zusammensetzt, eine ähnliche Verteilung aufweisen, so daß bei dem Serumpool ein im Schwerpunktbereich liegender Titer ermittelt werden müßte. Serumpools müßten demnach das Bild einer Herde ebenso widerspiegeln wie Einzelseren. Daher wurden auch Serumpools in die Untersuchung mit einbezogen.

Abbildung 9

Verteilung der Reo-Antikörpertiter (ELISA) bei Einzelseren aus 3 Herden

Anzahl der
Seren
in %



Herde

K

I

D

Anzahl
der
Seren

80

78

11

Alter
in
Wochen

24

24

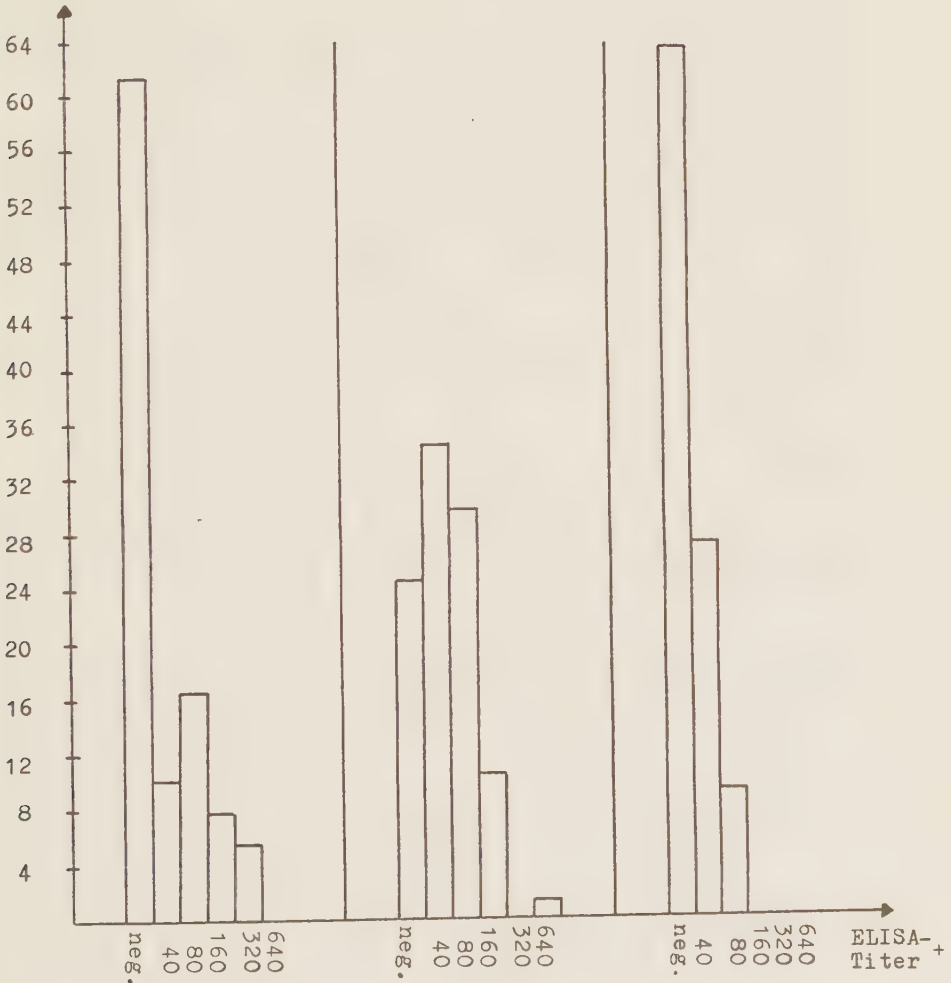
41

+ Reziproke Werte

Abbildung 10

Verteilung der AAAV-Antikörpertiter (ELISA) bei Einzelseren aus 3 Herden

Anzahl der
Seren
in %



Herde

K

I

D

Anzahl
der
Seren

80

78

11

Alter
in
Wochen

24

24

41

+ Reziproke Werte

Um festzustellen, wie weit Reovirus- und AAV-Infektionen in Elterntierbeständen verbreitet sind, wurden 859 Feldseren auf ihren Gehalt an Reo- und AAV-Antikörpern untersucht. Die Seren stammten von 12 bis 54 Wochen alten Hühnern aus 14 verschiedenen Beständen und waren zum größten Teil aus 5 oder 10 Einzelseren gepoolt. Sie waren in bestimmten Abständen gewonnen worden (12., 22., 30., 38., 46. und 54. Lebenswoche), wobei jedoch nicht aus allen Herden von jeder Altersstufe Seren zur Verfügung standen. Aus einigen Herden lagen auch noch zu anderen Zeitpunkten gewonnene Seren vor (14., 24., 26., 37. und 41. Lebenswoche).

Es zeigte sich, daß alle Herden mit Reovirus und AAV infiziert waren, d.h., es gab keine Herde, aus der alle untersuchten Seren negativ reagierten. In wenigen Herden waren jedoch alle zu einem bestimmten Zeitpunkt gewonnenen Seren negativ. So konnten in Herde C in den Seren der 18., 22. und 30. Woche keine AAV-Antikörper und in den Seren der 20. Woche keine Reo-Antikörper nachgewiesen werden. Ferner reagierten die Seren der Herde A in der 30. Woche gegen Reovirus und AAV und die Seren der Herde D ebenfalls in der 30. Woche gegen AAV negativ.

Bei allen Herden wurde aus den Reo- und AAV-Antikörpertitern der zum selben Zeitpunkt gewonnenen Seren der geometrische Mittelwert (GMT) errechnet. Die Tabellen 15 und 16 geben die durchschnittlichen Reo- bzw. AAV-Antikörpertiter zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten an. Die Titerverlaufskurven von drei Herden als repräsentative Beispiele für alle sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, zeigt Herde G einen steten Anstieg des Reo-Titers, der bis zur 22. Woche leicht und anschließend erheblich steiler verläuft. Herde B zeigt einen leichten Titeranstieg zur 38. Woche, dem ein geringfügiger Abfall zur 46. und ein erneuter steiler Anstieg zur 54. Woche folgen. Herde F zeigt ebenfalls einen leichten Titeranstieg zur 22. Woche, dann jedoch einen jähen Abfall zur 30. Woche und einen steilen Anstieg zur 38. Woche.

Betrachtet man die drei Kurven im Zusammenhang, so fällt auf, daß zu späteren Untersuchungszeitpunkten höhere Titer erreicht werden, wobei der steile Anstieg bei Herde B wesentlich später erfolgt als bei den Herden G und F.

Die Herden B und F stimmen darin überein, daß dem steilen Titeranstieg ein deutlicher Titerabfall vorausgeht.

Betrachtet man die Verlaufskurven der durchschnittlichen AAV-Antikörpertiter (Abb. 12), so fällt bei allen drei Kurven ein Abfall des Titers zur 18. bzw. 22. Woche auf, dem bei den Herden B und G ein leichter Anstieg folgt.

Die Titer der Herde B liegen zu allen Zeitpunkten unter denen der Herden G und F.

Tabelle 15

Mittlere Reo-Antikörpertiter (ELISA) von 14 Herden zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Herde	Alter in Wochen						
	12	18	22	30	38	46	54
A	80 +	80	80	20	113	202	285
B	46	63	80	80	113	70	258
C	54	38	28	20	113		62
D	80	80	95	80	45	202	
E	67	80	113	46	104	118	
F	45	54	59	25	138		
G	57	67	67	167	281		
H	80	85	197	285	277		
I	135	99	32	87			
K	92	77	95				
L	160	364	199				
M	40	49					
N	207	207					
O	254						

+ GMT (reziproke Werte), 20 entspricht negativ

Tabelle 16

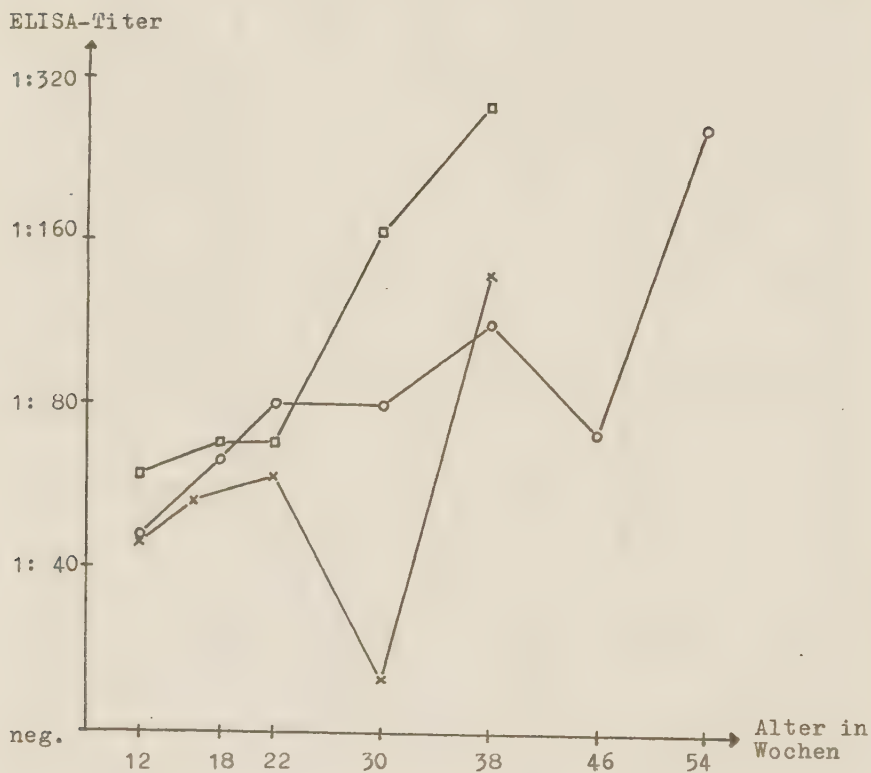
Mittlere AAV-Antikörpertiter (ELISA) von 14 Herden zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Herde	Alter in Wochen						
	12	18	22	30	38	46	54
A	40 ⁺	80	40	20	71	40	36
B	80	20	20	20	24	26	25
C	26	26	48	40	95		64
D	160	80	57	20	40	50	
E	57	135	113	28	30	35	
F	179	44	54	36	37		
G	113	95	30	44	44		
H	57	39	24	38	45		
I	52	80	25	46			
K	26	24	26				
L	34	37	52				
M	95	49					
N	80	40					
O	65						

⁺ GMT (reziproke Werte), 20 entspricht negativ

Abbildung 11

Verlaufskurven der mittleren Reo-Antikörpertiter (GMT)
von 3 Herden (ELISA)



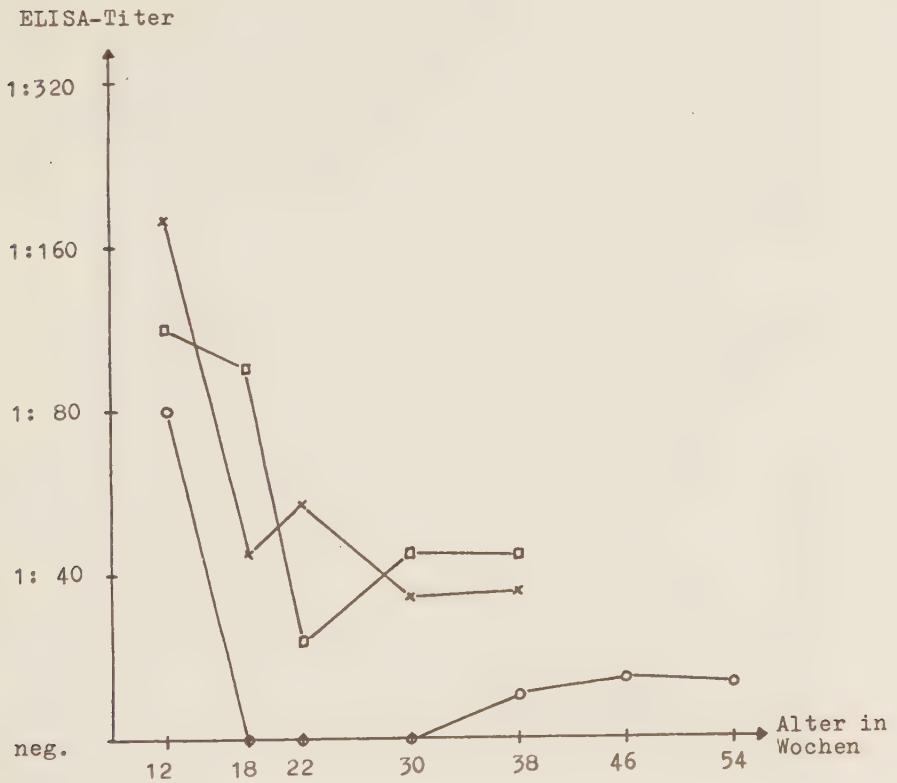
○—○ Herde B

x—x Herde F

□—□ Herde G

Abbildung 12

Verlaufskurven der mittleren AAV-Antikörpertiter (GMT)
von 3 Herden (ELISA)



○—○ Herde B

x—x Herde F

□—□ Herde G

Aus Tabelle 15 geht hervor, daß bei fast allen Herden die mittleren Reo-Antikörpertiter der späteren erheblich über denen der früheren Untersuchungszeitpunkte lagen, wobei meistens ein steiler Titeranstieg zur 30. oder 38. Woche hin erfolgte. Der Vorzeichentest macht dies deutlich. Bei allen 8 Herden, von denen Seren aus der 12. und 38. Woche zur Verfügung standen, wurde der GMT der 38. Woche von dem der 12. Woche subtrahiert und das Vorzeichen der Differenz betrachtet (vgl. Tab. 17). Bei 7 der 8 Herden trug die Differenz ein negatives Vorzeichen, der GMT der 38. Woche lag also bei fast allen Herden über dem der 12. Woche. Zusätzlich wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt, der ergab, daß der Unterschied der Titer zu den beiden Zeitpunkten signifikant ist ($\alpha = 0,05$).

Tabelle 17

Vergleich der mittleren Reo-Antikörpertiter (ELISA) der 12. und 38. Lebenswoche bei 8 Herden (Vorzeichentest)

Herde	Alter in Wochen		Differenz	Vorzeichen
	12	38		
A	80 ⁺	113	-33	-
B	46	113	-67	-
C	54	113	-59	-
D	80	45	+35	+
E	67	104	-37	-
F	45	138	-93	-
G	57	281	-224	-
H	80	277	-197	-

⁺ GMT (reziproke Werte), 20 entspricht negativ

Wie aus Tabelle 16 ersichtlich ist, lagen bei fast allen Herden die mittleren AAV-Antikörpertiter der früheren über denen der späteren Untersuchungszeitpunkte. Auch hier wurde der Vorzeichentest durchgeführt, wobei bei 9 Herden der GMT der 30. Woche von dem der 12. Woche subtrahiert wurde. Wie Tabelle 18 zeigt, trug die Differenz bei 8 der 9 Herden ein positives Vorzeichen, die Titer lagen also in der 30. Woche bei fast allen Herden niedriger als in der 12. Woche. Der Wilcoxon-Test ergab wiederum, daß der Unterschied der Titer zu den beiden Zeitpunkten signifikant ist ($\alpha = 0,05$).

Tabelle 18

Vergleich der mittleren AAV-Antikörpertiter (ELISA) der 12. und 30. Lebenswoche bei 9 Herden (Vorzeichentest)

Herde	Alter in Wochen		Differenz	Vorzeichen
	12	30		
A	40 ⁺	20	+20	+
B	80	20	+60	+
C	26	40	-14	-
D	160	20	+140	+
E	57	28	+29	+
F	179	36	+143	+
G	113	44	+69	+
H	57	38	+19	+
I	52	46	+6	+

⁺ GMT (reziproke Werte), 20 entspricht negativ

Wie weiter aus Tabelle 16 hervorgeht, lagen die AAV-Titer der 38. Woche bei fast allen Herden über denen der 30. Woche. In Tabelle 19 ist das Ergebnis eines dritten Vorzeichentests dargestellt, für den bei 9 Herden der GMT der 38. Woche von dem der 30. Woche subtrahiert wurde. Die Differenz trug außer bei einer Herde, bei der der GMT der 30. Woche gleich dem der 38. Woche war, bei allen Herden ein negatives Vorzeichen, die Titer der 38. Woche lagen also höher als die der 30. Woche. Der Wilcoxon-Test ergab auch hier einen signifikanten Unterschied der Titer zu den beiden Zeitpunkten ($\alpha = 0,05$).

Tabelle 19

Vergleich der mittleren AAV-Antikörpertiter (ELISA) der 30. und 38. Lebenswoche bei 8 Herden (Vorzeichentest)

Herde	Alter in Wochen		Differenz	Vorzeichen
	30	38		
A	20 +	71	-51	-
B	20	24	-4	-
C	40	95	-75	-
D	20	40	-20	-
E	28	30	-2	-
F	36	37	-1	-
G	44	44	0	/
H	38	45	-7	-

+ GMT (reziproke Werte), 20 entspricht negativ

Aus den geometrischen Mittelwerten der Antikörpertiter aller Herden wurde für jede Altersstufe wiederum der GMT errechnet. Die Titer sind den Tabellen 20 und 21 zu entnehmen. Die sich hieraus ergebenden Verlaufskurven der Reo- und AAAV-Antikörpertiter sind in Abbildung 13 dargestellt. Ebenso wie bei den Titerverlaufskurven der einzelnen Herden ist auch hier zu sehen, daß die Reo-Titer in der 38. bis 54. Woche deutlich höher lagen als in der 12. bis 30. Woche. Während der GMT bis zur 22. Woche um 1:80 lag und zur 30. Woche noch leicht abfiel, erfolgte zur 38. Woche ein steiler Titeranstieg auf ein hohes Plateau. So lagen die mittleren Titer der 38., 46. und 54. Woche um 1:135.

Der GMT der AAAV-Antikörper fiel von der 12. (1:64) zur 30. Woche (1:31) deutlich ab, um dann wieder leicht anzusteigen. In der 38. bis 54. Woche bewegte sich der GMT um 1:40.

Die Untersuchungen über die Abhängigkeit der Reo- und AAAV-Antikörpertiter vom Alter der Tiere ergaben, daß die Reo-Titer mit zunehmendem Lebensalter anstiegen. Die AAAV-Titer hingegen fielen bis zur 30. Lebenswoche kontinuierlich ab und stiegen dann wieder an.

Tabelle 20

Geometrischer Mittelwert der Reo-Herdentiter bei verschiedenen Altersstufen

Alter in Wochen	12	18	22	30	38	46	54
GMT ⁺	84	84	80	61	128	135	142
Anzahl der Betriebe	14	13	11	9	8	4	3

⁺ reziproke Werte

Tabelle 21

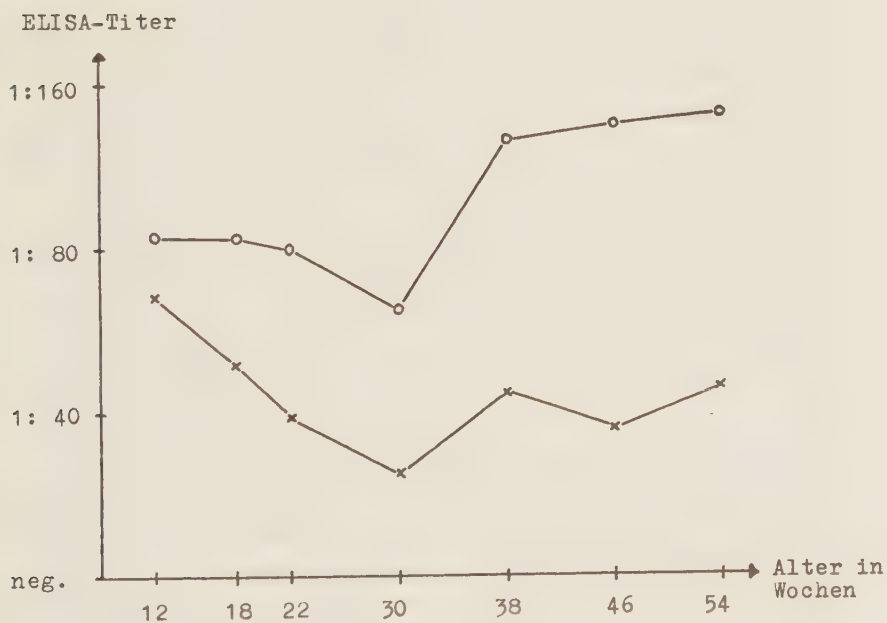
Geometrischer Mittelwert der AAV-Herdentiter bei verschiedenen Altersstufen

Alter in Wochen	12	18	22	30	38	46	54
GMT ⁺	64	49	39	31	44	37	45
Anzahl der Betriebe	14	13	11	9	8	4	3

⁺ reziproke Werte

Abbildung 13

Verlaufskurven der mittleren Reo- und AAV-Antikörpertiter (GMT) aller untersuchten Herden



○—○ Reo-Antikörpertiter

×—× AAV-Antikörpertiter

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den ELISA auf seine Eignung zum Nachweis von Antikörpern gegen Reovirus und AAV zu prüfen und die Verbreitung von Reovirus- und AAV-Infektionen in Elterntierbeständen zu untersuchen.

In ersten Versuchen wurden verschiedene Antigen-Präparationen für den ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren geprüft (vgl. 4.1.1.). Es zeigte sich, daß nur hochgereinigtes Material zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. Durch eine CsCl-Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation gelang es, die unspezifischen Bindungen so stark zu reduzieren, daß die Verdünnungsstufe des Serums 1:40 schon in die Bewertung mit einbezogen werden konnte. Bei Verwendung von weniger noch gereinigtem Antigenmaterial kam es zu einer Erhöhung der unspezifischen Bindungen und somit zu einer Verringerung der Spezifität und Sensibilität des ELISA. Ähnliche Beobachtungen machten SLAGHT und Mitarbeiter (42), deren Untersuchungen ergaben, daß mit ungereinigtem Virusmaterial als Antigen Seren erst ab einer Verdünnungsstufe von 1:100 spezifisch beurteilt werden können. Dies hat zur Folge, daß schwach positive Seren nicht mehr als positiv erkannt werden.

Ein weiterer Aspekt, der für eine höhere Reinigung des Virusmaterials spricht, ist die damit verbundene Arbeitseinsparung. Zwar ist ein Reinigungsschritt mehr durchzuführen, und die Menge des gewonnenen Materials reduziert sich dabei auf ein Viertel, dieses kann dann jedoch 20mal so stark verdünnt werden wie das Material aus der Stufengradienten-Zentrifugation. Mit einer Virus-Präparation können so 5mal so viele Seren untersucht werden.

Eine Beschichtung der Platten mit hitzeinaktiviertem Kälberserum und Glutaraldehyd-Lösung vor der Antigeninkubation, wie sie bei SLAGHT et al. (42) beschrieben ist, erwies sich bei Verwendung von noch gereinigtem Virusmaterial als Antigen als überflüssig, wie in hier nicht beschriebenen Untersuchungen bestätigt werden konnte.

Für den ELISA zum Nachweis von AAV-Antikörpern war eine Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation unerlässlich, um eine weitgehende Trennung von Adenovirus- und AAV-Partikeln zu erreichen. Eine zweifache Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation brachte gegenüber der einmaligen keine Vorteile. Schon nach einmaliger Gleichgewichtsgradienten-Zentrifugation war die unspezifische Reaktion in Form einer Hintergrundfärbung so gering, daß sie vernachlässigt werden konnte, obwohl in der auf diese Weise gewonnenen Virusbande noch Adenoviren nachweisbar sind (BAUER, mündliche Mitteilung). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu denen von DAWSON und Mitarbeitern (7), die das Virusmaterial 6mal im Gleichgewichtsgradienten reinigten. Anschließend führten sie eine Langzeitdialyse über 4 Tage durch. In der vorliegenden Arbeit erwies sich eine Dialyse von 3mal 2 Stunden als völlig ausreichend. Hinzu kommt, daß das Antigen 1:200 bis 1:600 verdünnt werden konnte, während DAWSON et al. mit einer Antigenverdünnung von 1:50 arbeiteten (vgl. 4.1.2.).

Bei den Untersuchungen zur Festlegung der Unterscheidungsgrenze von positiven und negativen Seren erwies es sich als sehr wichtig, neben Normalseren auch gegen andere Virusarten gerichtete Hyperimmunseren in die Untersuchung mit einzubeziehen (vgl. 4.2.). Aufgrund ihres höheren Gehaltes an Antikörpern kam es bei den Hyperimmunseren zu stärkeren unspezifischen Bindungen und somit zu höheren Extinktionswerten. Nur auf diese Weise kann die Spezifität des ELISA-Systems überprüft werden. Es empfiehlt sich ferner, jede neue Antigencharge durch Untersuchung einiger Normal- und Hyperimmunseren auf ihre Spezifität zu untersuchen.

Versuche zur Überprüfung der Spezifität des AAV-ELISA ergaben, daß es durch Adenovirus-Antikörper zu keinen positiven Reaktionen kam. Dies ist insofern von großer Bedeutung, als in allen AAV-positiven, aber auch in vielen AAV-negativen Feldseren Antikörper gegen Adenoviren enthalten sind, die auf die Reaktion im AAV-ELISA keinen Einfluß haben sollten.

Die Sensibilität des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren wurde zunächst in kleinem Umfang (20 Seren) getestet, wobei der ELISA mit dem IF-Test und der AGP verglichen wurde (vgl. 4.3.1.1.). Es zeigte sich, daß im ELISA stark positive Seren sowohl im IF-Test als auch in der AGP positiv reagierten. Die im ELISA schwach positiven Seren waren im IF-Test positiv, in der AGP jedoch zum Teil negativ. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte zwischen der Sensibilität von ELISA und IF-Test nicht unterschieden werden, während die AGP deutlich weniger sensitiv reagierte. Dies bestätigt die Ergebnisse von SLAGHT et al. (42), die ebenfalls die Sensibilität des ELISA im Vergleich zur AGP untersuchten. Auf die Überlegenheit des IF-Testes gegenüber der AGP hinsichtlich der Sensibilität beim Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren weist auch VON BÜLOW (4) hin.

Umfangreichere Untersuchungen über die Sensibilität von ELISA und IF-Test ergaben, daß 17 % der im IF-Test negativen Seren im ELISA positiv reagierten (vgl. 4.3.1.2.). Umgekehrt waren nur 2 % der im IF-Test positiven Seren im ELISA negativ. Diese Ergebnisse deuten auf eine leichte Überlegenheit des ELISA gegenüber dem IF-Test hinsichtlich der Sensibilität hin.

Bei Untersuchungen zum Vergleich der Titer aus dem ELISA und IF-Test zeigte sich, daß die mit dem IF-Test erzielten Titer um 1 bis 2 Verdünnungsstufen höher lagen als die mit dem ELISA erzielten. Bei Berücksichtigung der Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Fluoreszenz in den Endverdünnungen im IF-Test können die im ELISA und IF-Test ermittelten Titer durchaus als vergleichbar angesehen werden.

Ein weiterer Versuch verglich die Sensibilität des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen AAV mit der der AGP (vgl. 4.3.2.1.). Hierbei zeigte sich, daß selbst Feldseren, mit denen im ELISA Titer bis zu 1:320 erreicht wurden, in der AGP keine Präzipitationslinien bildeten. Zur Kontrolle mitgeführte Tipton-Hyperimmunseren zeigten eine starke Präzipitation. Die AGP zum Nachweis von AAV-Antikörpern

erwies sich also als weit weniger sensibel als der ELISA. Nur bei Seren mit hohen AAAV-Antikörpertitern konnten präzipitierende Antikörper nachgewiesen werden.

Die Durchführung eines IF-Testes zum Nachweis von Antikörpern gegen AAAV ist insofern schwierig, als zur Anzüchtung des AAAV immer ein Helfer-Adenovirus notwendig ist. Es gelang nicht, die Adenoviren durch ein Antiserum gegen aviäre Adenoviren vom Kaninchen vollständig zu blockieren und so eine Anlagerung der Adenovirus-Antikörper aus den Hühnerseren zu verhindern.

In Versuchen, die Deckgläser mit gereinigten AAAV-Präparationen zu beimpfen, zeigte sich, daß auch hier noch genügend Adenoviren als Helfer für die Vermehrung des AAAV zur Verfügung standen. Es kam daher neben einer Vermehrung des AAAV auch zu einer starken Vermehrung der Adenoviren, so daß selbst ein hochtitriges Antiserum gegen homologe aviäre Adenoviren vom Kaninchen nicht in der Lage war, das gesamte Adenovirus-Antigen abzusättigen. So kam es auch nach Beimpfung der Deckgläser mit gereinigten Virus-Präparationen zu einer Anlagerung der in allen AAAV-Antiseren vorhandenen Adenovirus-Antikörper der Hühnerseren an noch freies Antigen und dadurch zu einer Fluoreszenz.

Würde man die Deckgläser ausschließlich mit AAAV beimpfen, so käme es zu keiner Virusvermehrung und somit zu keiner Fluoreszenz der AAAV-positiven Seren.

Nach artifiziemeller Infektion von Versuchstünnern mit AAAV und Adenovirus (Dipton B) waren Antikörper gegen beide Viren eine Woche p.i. nachzuweisen (vgl. 4.4.). Die AAAV-Serumtitel erreichten nach einem Titeranstieg bis zur 6. Woche p.i. ein Niveau, das im weiteren Verlauf keine wesentliche Änderung mehr erfuh. Bis zum Versuchsende in der 12. Woche kam es zu keinem Abfall der Serumtitel.

Anders verhielten sich die Adenovirus-Antikörpertiter. Sie stiegen bis zur 8. Woche p.i. an, fielen zur 9. Woche deutlich ab und stiegen anschließend bis zum Versuchsende in der

12. Woche erneut an. Dies deutet darauf hin, daß die Antikörperbildung ihr Maximum 8 Wochen p.i. erreichte und anschließend wieder zurückging. Der folgende Anstieg zur 10. Woche ist nur durch eine erneute Vermehrung der Adenoviren zu erklären.

Durch Untersuchung von Feldseren aus 14 Beständen im ELISA sollte geprüft werden, wie weit Reovirus- und AAV-Infektionen in Elterntierbeständen verbreitet sind und ob zwischen der Titerhöhe und dem Alter der Tiere ein Zusammenhang besteht (vgl. 4.5.).

Vor der Untersuchung der Feldseren wurde in einem Vorversuch geklärt, ob auch Serumpools in die Untersuchung mit einbezogen werden konnten. Da die Verteilung der Serumtiter von Einzelseren innerhalb einer Herde zu einem bestimmten Zeitpunkt einen deutlichen Schwerpunkt aufwies, konnte davon ausgegangen werden, daß der bei einem Serumpool ermittelte Titer mit großer Wahrscheinlichkeit in diesem Schwerpunktbereich liegt und daher Serumpools für die Untersuchung ebenfalls geeignet waren.

Die Untersuchung der Feldseren ergab, daß Reovirus- und AAV-Infektionen bei Hühnern im Alter von 12 bis 54 Wochen stark verbreitet sind. In allen Herden waren Antikörper gegen Reovirus und AAV nachzuweisen.

Zur Klärung der Frage, ob Titerhöhe und Alter der Tiere in einem Zusammenhang stehen, wurden die mittleren Titer der einzelnen Altersstufen sowohl innerhalb der einzelnen Herden als auch für alle Herden zusammen miteinander verglichen. Die Verlaufskurven der mittleren Titer gegen Reoviren der einzelnen Herden zeigten insofern Übereinstimmung, als die Titer der jüngeren Tiere bei fast allen Herden deutlich niedriger lagen als die der älteren Tiere. Der Zeitpunkt des Anstiegs war bei den einzelnen Herden unterschiedlich und lag zwischen der 22. und 38. Woche (vgl. Abb. 11 und Tab. 15). Der Wilcoxon-Test ergab einen signifikanten Unterschied in der Titerhöhe zwischen der 12. und 38. Woche.

Die mittlere Titerverlaufskurve aller Herden zeigt ein

ähnliches Bild, die mittleren Titer der 38 bis 54 Wochen alten Tiere lagen höher als die der 12 bis 30 Wochen alten Tiere.

Die Verlaufskurven der mittleren AAV-Antikörpertiter der einzelnen Herden zeigten ebenfalls untereinander ein ähnliches Bild. Die Titer lagen in der 12. Woche relativ hoch, fielen bis zur 22. bis 30. Woche steil ab und stiegen dann erneut leicht an. Der Wilcoxon-Test ergab sowohl für den steilen Abfall von der 12. zur 30. Woche als auch für den leichten Anstieg von der 30. zur 38. Woche einen signifikanten Unterschied der Titerhöhe (vgl. Abb. 12 und Tab. 16).

Die mittlere Titerverlaufskurve aller Herden zeigte ebenfalls einen Titerabfall zur 30. Woche, dem ein leichter Anstieg folgte.

Alle Seren wurden, nicht im Rahmen dieser Arbeit, auch auf Antikörper gegen Adenoviren untersucht. Sie waren je nach Herde und Alter gegen unterschiedliche Serotypen positiv. In der Regel reagierten die jüngeren Herden nur gegen einige und die älteren gegen alle Serotypen positiv.

In keiner Herde traten ausschließlich Adenovirus-Antikörper auf, immer waren auch Antikörper gegen AAV nachzuweisen. Demgegenüber reagierten von 67 Seren, die gegen alle Serotypen des Adenovirus positiv waren, 44 gegen AAV negativ. Relationen zwischen einzelnen Serotypen des Adenovirus und AAV waren nicht festzustellen. Ebensowenig konnten Relationen zwischen der Titerhöhe der AAV- und Adenovirus-Antikörper nachgewiesen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der indirekte Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde auf seine Eignung für den Nachweis von Antikörpern gegen Reovirus und Adeno-assoziiertes Virus in Hühnerseren geprüft.

Die Untersuchung verschiedener Antigen-Präparationen ergab, daß in beiden ELISA-Systemen nur im CsCl-Stufen- und Gleichgewichtsgradienten gereinigtes Virusmaterial zufriedenstellende Ergebnisse lieferte.

Als Unterscheidungsgrenze zwischen positiven und negativen Seren wurde aufgrund der Untersuchung von 27 Normalseren sowie einigen gegen Reovirus bzw. AAV negativen Hyperimmunsereen ein Extinktionswert von 0,200 in der Serumverdünnung 1:40 festgelegt.

Die Spezifität des AAV-ELISA gegenüber Antikörpern gegen Adenoviren wurde durch Untersuchung von 67 gegen alle Serotypen des Adenovirus positiven Feldseren überprüft. Trotz hoher Antikörpertiter gegen Adenoviren waren 44 Seren gegen AAV negativ.

Hinsichtlich der Sensibilität erwies sich der ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren der AGP stark überlegen und dem IF-Test gleichwertig. Der AAV-ELISA erwies sich als erheblich sensibler als die AGP.

Immunisierungsversuche mit Adenovirus und AAV ergaben, daß Antikörper gegen beide Viren schon eine Woche p.i. nachzuweisen waren. Während der AAV-Antikörpertiter seinen in der 6. Woche erreichten Maximalwert bis zum Versuchsende in der 12. Woche beibehielt, fiel der Adenovirus-Antikörpertiter zur 9. Woche ab, stieg aber dann erneut bis zum Versuchsende an.

Untersuchungen von Elterntierbeständen auf Reovirus- und AAV-Infektionen ergaben, daß in allen untersuchten Herden Antikörper gegen Reovirus und AAV nachzuweisen waren. Die Antikörpertiter gegen Reoviren nahmen mit steigendem Alter zu. Die AAV-Antikörpertiter fielen hingegen nach der 12. Lebenswoche ab und stiegen um die 30. Lebenswoche wieder an.

SUMMARY

The indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was tested with respect to its ability to detect antibodies against reovirus and avian adeno-associated virus in chicken sera. Examination of various antigen preparations showed that in both ELISA systems satisfactory results were obtained with virus material purified by discontinuous CsCl gradient and CsCl equilibrium density centrifugation.

The optical density of 0,200 of serum dilution 1:40 was fixed as level of discrimination between positive and negative sera on the base of the examination of 27 normal sera as well as several hyperimmun sera negative against reovirus respectively adeno-associated virus (AAAV).

The specificity of the ELISA for detection of AAAV antibodies with regard to antibodies against adenovirus was tested by examination of 67 field sera reacting positively in neutralization test to all serotypes of adenovirus. In spite of high antibody titres against adenovirus 44 sera were negative to AAAV.

The sensibility of the ELISA proved superior to precipitation test and equal to immunofluorescence assay. The ELISA for detection of antibodies to AAAV proved notably more sensible than precipitation test.

In immunisation experiments with adenovirus and AAAV it could be shown that antibodies against both viruses were detectable already one week after vaccination. Whereas AAAV antibody titres kept its maximal value reached during the 6th week till the end of the experiment in the 12th week, the adeno-virus antibody titres decreased until the 9th week and increased again until the end of the experiment.

Examination of parent stocks for reovirus and AAAV infections showed that in all farms examined antibodies against reovirus and AAAV were found. Antibody titres against reovirus increased with age. AAAV antibody titres decreased after the age of 12 weeks and increased again approximately at the age of 30 weeks.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARCHETTI, I., BEREZKY, E. and BOCCIARELLI, D.S. (1966)
A small virus associated with simian adenovirus
SV 11
Virology 29, 671-673
2. BAINS, B.S., MacKENZIE, M. and SPRADBROW, P.B. (1974)
Reovirus-assoziated mortality in broiler
chickens
Avian Dis. 18, 472-476
3. BIDWELL, D.E., BARTLETT, A. and VOLLER, A. (1977)
Enzymeimmunoassay for viral diseases
J. Inf. Dis. 136, 274-278
4. VON BÜLOW, V. (1979)
Inapparente Reovirus-Infektion einer isolierten
Rhodeländer-Herde: Diagnose und serologische
Untersuchungen
Zbl. Vet. Med. B, 26, 805-819
5. VON BÜLOW, V., WEILAND, F. und MATTHAEUS, W. (1980)
Bedeutung des aviären Adeno-assozierten Virus
(AAAV) bei serologischen Untersuchungen über
Adenovirus-Infektionen des Huhnes
Zbl. Vet. Med. B, 27, 470-482
6. DAWSON, G.J., CHANG, P.W., YATES, V.J. and FRY, D.E.
(1980)
Neutralizing Antibodies to Cello and Avian
Adenovirus-Associated Viruses in the Albumen
of Chicken Eggs
Avian Dis. 24, 890-895

7. DAWSON, G.J., ORSI, L.N., YATES, V.J., CHANG, P.W.
and PRONOVOST, A.D. (1979)
An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for
Detection of Antibodies to Avian Adenovirus
and Avian Adenovirus-Associated Virus in
Chickens
Avian Dis. 24, 393-402
8. DESHMUKH, D.R. and POMEROY, B.S. (1969 a)
Avian Reoviruses. I. Isolation and serological
Characterization
Avian Dis. 13, 239-243
9. DESHMUKH, D.R. and POMEROY, B.S. (1969 b)
Avian Reoviruses. III. Infectivity and
Egg transmission
Avian Dis. 13, 427-439
10. ENGVALL, E. and PERLMANN, P. (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochem. 8, 871-874
11. ENGVALL, E. and RUOSLATHI, E. (1979)
Principles of ELISA and recent applications
to the study of molecular interactions in
Immunoassays in the clinical laboratory, 89-97
Editors: Nakamura, R.M., Dito, W.R. and
Tucker, E.S.
Alan R. Liss, Inc., New York
12. FAHEY, J.E. and CRAWLEY, J.F. (1954)
Studies on chronic respiratory disease of
chickens. II. Isolation of a virus
Canadian Journal of Comparative Medicine 18,
13-21

13. FUJISAKI, Y., KAWAMURA, H. and ANDERSON, D.P. (1969)
Reoviruses isolated from turkeys with
bluecomb
Am. Journ. of Vet. Res. 30, 1035-1043
14. GARCIA, Z. and BANKOWSKI, R.A. (1981)
Comparison of a tissue-culture virus neutralization test and the Enzym-linked Immunosorbent Assay for measurement of antibodies to infectious bronchitis
Avian Dis. 25, No. 1, 121-129
15. GERSHOWITZ, A. and WOOLEY, R.E. (1973)
Characterization of two reoviruses isolated from turkeys with infectious enteritis
Avian Dis. 17, 406-414
16. GLASS, S.E., NAQI, S.A., HALL, C.F. and KERR, K.M. (1972)
Isolation and Characterization of a Virus Associated with Arthritis of Chickens
Avian Dis. 17, 415-424
17. HERLING, A. (1981)
Indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bronchitis der Hühner
Diss. Berlin
18. HERLING, A., MONREAL, G. und VON BÜLOW, V. (1981)
Standardisierung eines indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Hühner-Bronchitis-virus
Zbl. Vet. Med. B, 28, 693-703

19. HOGGAN, M.D. (1965)
Presence of small virus-like particles in
various adenovirus type 2, 5, 7 and 12
preparations
Fed. Proc. 24, 248, Abstract 665
20. JONES, R.C., JORDAN, F.T.W. and LIOUPIS, S. (1975)
Characteristics of reovirus isolated from
ruptured gastrocnemius tendons of chickens
Vet. Rec. 96, 153-154
21. JONES, R.C. and ONUNKWO, O. (1978)
Studies on Experimental Tenosynovitis in
Light Hybrid Chickens
Avian Pathology 7, 171-181
22. KAWAMURA, H., SHIMIZU, F., MAEDA, M. and TSUBAHARA, H.
(1965)
Avian reovirus: Its properties and serological
classification
Nat. Inst. Anim. Health Q. 5, 115-124
23. KRAUSS, H. and UEBERSCHÄR, S. (1966)
Zur Struktur eines neuen Geflügel-Orphan Virus
Zbl. Vet. Med. 13, B, 239-249
24. LUCHSINGER, E., STROBBE, R., WELLEMAN, G., DEKEGEL, D.
and SPRECHER-GOLDBERGER, S. (1970)
Haemagglutinating adeno-associated virus (AAV)
in association with Bovine adenovirus type 1
Arch. Gesamte Virusforschung 31, 390-392
25. MacDONALD, J.W., RANDALL, C.J., DAGLESS, M.D. and
McMARTIN, D.A. (1978)
Observations on Viral Tenosynovitis (Viral
Arthritis) in Scotland
Avian Pathology 7, 471-482

26. MARQUARDT, W.W., JOHNSON, R.B., ODENWALD, W.F. and SCHLOTTHOBER, B.A. (1980)
An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus
Avian Dis. 24, 375-385
27. MARQUARDT, W.W., SNYDER, D.B. and SCHLOTTHOBER, B.A. (1981)
Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay
Avian Dis. 25, No. 3, 713-722
28. MENENDEZ, N.A., CALNEK, B.W. and COWEN, B.S. (1974)
Experimental Egg-Transmission of Avian Reovirus
Avian Dis. 19, 104-111
29. MEULEMANS, G. and HALEN, P. (1982)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum
Avian Pathology 11, 361-368
30. EL MISHAD, A.M., McCORMICK, K.J., YATES, V.J. and TRENTIN, J.J. (1974)
Detection and serological Identification of Adeno-Associated Virus in Avian Adenovirus Stocks
Infection and Immunity 11, 287-289
31. MOCKETT, A.P.A. and DARBYSHIRE, J.H. (1981)
Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus
Avian Pathology 10, 1-10

32. MONREAL, G. und DORN, R. (1981)
Vergleichende Untersuchungen zum Antikörper=
nachweis bei Hühneradeno- und Egg-drop=
syndrom 76 Virus-Infektionen
Deutsche tierärztl. wtschr. 88, 508-511
33. MUSTAFFA-BABJEE, A., SPRADBROW, P.B. and OMAR, A.R. (1974)
Characterization of an avian reovirus isolated
in Queensland
Journal of Comparative Pathology 83, 387-400
34. OLSON, N.O. (1978)
Reovirus Infections
in: Diseases of Poultry, 641-647, Seventh Edition
Edited by Hofstad, M.S. with Calnek, B.W.,
Helmboldt, C.F., Reid, W.M. and Yoder, H.W., jr.
Iowa State University Press / Ames, Iowa, USA
35. OLSON, N.O., SHELTON, D.C. and MUNRO, D.A. (1957)
Infectious synovitis control by medication:
Effect of strain differences and pleuro=
pneumonia-like organisms
Am. Journ. of Vet. Res. 18, 735-739
36. OLSON, N.O. and WEISS, R. (1972)
Similarity between arthritis virus and
Fahey-Crawley virus
Avian Dis. 16, 535-540
37. PRONOVOST, A.D., YATES, V.J. and FRY, D.E. (1977)
Effect of Avian Adeno-Associated Virus on
Pathogenicity of Tipton Virus in Chicks
Avian Dis. 22, 354-357
38. REED, L.J. and MUENCH, H. (1938)
A simple method of estimating fifty per cent
endpoint
Am. J. Hyg. 27, 493-497

39. RHEE, Y.O. (1976)
Characterization of Avian Adenovirus Assozi-
ated Virus
Ph. D. Thesis, University of Rhode Island
40. SCHAFFNER, W. and WEISSMANN, C. (1973)
A rapid, sensitive and spezific method for the
determination of protein in dilute solution
Analytical Biochemistry 56, 502-514
41. SCOTT, M. and McFERRAN, J.B. (1972)
Isolation of adenoviruses from turkeys
Avian Dis. 16, 413-420
42. SLAGHT, S.S., YANG, T.J., VAN DER HEIDE, L. and
FREDRICKSON, T.N. (1978)
An Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
for Detecting Chicken Anti-reovirus Antibody
at High Sensitivity
Avian Dis. 22, 802-805
43. SOULA, A. and MOREAU, Y. (1981)
Antigen requirements and specifity of a micro-
plate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
for detecting infectious bronchitis viral
antibodies in cnicken serum
Archives of Virology 67, 283-297
44. SUGIMURA, T. and YANAGAWA, R. (1968)
Effect of sodium deoxycnolate on infectious
canine hepatitis virus, an additional description
of a small associated virus
Jap. J. Vet. Res. 16, 1-12

45. VAN DER HEIDE, L., GEISLER, J. and BRYANT, E.S. (1973)
Infectious Tenosynovitis: Serologic and
Histopathologic Response after Experimental
Infection with a Connecticut Isolate
Avian Dis. 18, 289-296
46. VAN DER HEIDE, L. and KALBAC, M. (1975)
Infectious Tenosynovitis (Viral Arthritis):
Characterization of a Connecticut Viral Isolant
as a Reovirus and Evidence of Viral Egg Trans-
mission by Reovirus-Infected Broiler Breeders
Avian Dis. 19, 683-688
47. VAN WEEMEN, B.K. and SCHUURS, A.H.W.M. (1971)
Immunoassay using antigen enzym conjugates
FEBS Letters 15, 232
48. VOLLER, A., BIDWELL, D.E. and BARTLETT, A. (1976)
Enzyme immunoassay in diagnostic medicine-
theory and practice
Bull. WHO 53, 55-65
49. WALKER, E.R., FRIEDMAN, M.H. and OLSON, N.O. (1972)
An electron microscopic study of an avian
reovirus that causes arthritis
Journal of Ultrastructural Research 41, 67-79
50. WIEGMANN, J. (1982)
Untersuchungen über die Einsatzmöglichkeiten
des indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assay
(ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen das
Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner
Diss. Berlin

51. WOOLEY, R.E. and GRATZEK, J.B. (1969)
Certain characteristics of viruses isolated
from turkeys with bluecomb
Am. Journ. of Vet. Res. 30, 1027-1033
52. YATES, V.J., EL MISHAD, A.M., McCORMICK, K.J. and
TRENTIN, J.J. (1973)
Isolation and Characterization of an Avian
Adenovirus-Associated Virus
Infection and Immunity 7, 973-980
53. YATES, V.J., RHEE, Y.O., FRY, D.E., EL MISHAD, A.M.
and McCORMICK, K.J. (1975)
The Presence of Avian Adenoviruses and Adeno-
Associated Viruses in Healthy Chickens
Avian Dis. 20, 146-152
54. YATES, V.J., RHEE, Y.O. and FRY, D.E. (1977)
Serological Response of Chickens Exposed to a
Type 1 Avian Adenovirus Alone or in Combination
with the Adeno-Associated Virus
Avian Dis. 21, 408-414
55. YOUNG, J.F. and MAYOR, D. (1979)
Adeno-Associated Virus - an Extreme State of
Viral Defectiveness
Prog. med. Virol. 25, 113-132

Herrn Prof. Dr. G. Monreal danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme im Institut und seine mir jederzeit gewährte wissenschaftliche und menschliche Unterstützung und Beratung.

Herrn Dr. Bauer bin ich für seine umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. V. von Bülow danke ich für seine vielen wertvollen Ratschläge.

Ganz herzlich möchte ich Frau Bayer für ihre technische Assistenz danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Weiß für die biometrische Beratung.

Allen Angehörigen des Institutes danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

03.06.1956	geboren in Berlin-Wilmersdorf
1963 - 1967	Besuch der Zinnowwald-Grundschule in Berlin-Zehlendorf
1967 - 1969	Besuch der Nord-Grundschule (Lateinklasse) in Berlin-Zehlendorf
1969 - 1975	Besuch der Schadow-Oberschule (Gymnasium) in Berlin-Zehlendorf
1975	Abitur
1976 - 1982	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
09.02.1982	Approbation als Tierärztin
ab Feb. 1982	Arbeit an der Dissertation bei Herrn Prof. Dr. G. Monreal



D. Hansen & K. Höpfner GbR

DISSERTATIONSDRUCK

Pestalozzistraße 106 (Ecke Bleibtreustraße)
Telefon 312 50 93 und 312 50 94

